

**Nachweis von *SRSF2*-Mutationen bei der chronisch  
myelomonozytären Leukämie und verwandten  
myeloischen Neoplasien in Knochenmarksbiopsien**

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

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

**vorgelegt von**

**Abele, Manuel Sebastian**

**2016**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. la Fougère

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung.....	12
1.1 Maligne Erkrankungen des Knochenmarks.....	12
1.1.1 Grundlagen zur Hämatopoese und assoziierten Neoplasien.....	12
1.1.2 Myeloproliferative Neoplasien.....	15
1.1.3 Myelodysplastische Syndrome .....	16
1.1.4 Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien.....	16
1.2 Die Chronisch myelomonozytäre Leukämie - Grundlagen zur Erkrankung.....	17
1.2.1 Epidemiologie .....	17
1.2.2 Klinik.....	17
1.2.3 Subgruppen der Erkrankung, Prognose .....	18
1.2.4 Therapie .....	19
1.3 Die chronisch myelomonozytäre Leukämie - Diagnostik.....	20
1.3.1 Diagnosekriterien.....	20
1.3.2 Differentialdiagnosen und diagnostische Problematik .....	21
1.3.3 Blutbild und Blutausstrich .....	22
1.3.4 Histologie und Immunhistochemie.....	23
1.3.5 Genetische Veränderungen.....	25
1.4 <i>SRSF2</i> .....	26
1.4.1 Funktion.....	26
1.4.2 Charakterisierung der Mutationen in <i>SRSF2</i> .....	28
1.4.3 Die Rolle von <i>SRSF2</i> -Mutationen bei der CMML.....	29

1.4.4	Methoden zur Mutationsanalyse .....	29
1.4.5	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse).....	30
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	32
2.	Material und Methoden .....	34
2.1	Material .....	34
2.1.1	Geräte.....	34
2.1.2	Reagenzien .....	35
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	36
2.1.4	Kits.....	36
2.1.5	Enzyme.....	36
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	36
2.1.7	Primer .....	37
2.1.8	Sonden .....	38
2.2	Patientenkollektiv .....	39
2.2.1	Knochenmarksbiopsien .....	39
2.2.2	Zusammensetzung der Studiengruppe.....	39
2.2.3	Zusammensetzung der Kontrollgruppen.....	39
2.3	Methoden .....	40
2.3.1	Histologische und klinische Klassifikation.....	40
2.3.2	Isolation und Aufreinigung von DNA aus Paraffingewebe .....	41
2.3.3	PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA.....	42
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.3.5	<i>SRSF2</i> -PCR .....	44
2.3.6	<i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse mittels Sanger Sequenzierung .....	45
2.3.7	RFLP-Analyse zur Detektion von <i>SRSF2</i> -Mutationen .....	48

2.3.8	Mutationsanalyse der <i>JAK2</i> - und <i>KIT</i> -Hotspots .....	48
2.3.9	Statistische Auswertung .....	50
3.	Ergebnisse .....	51
3.1	Histologische und klinische Klassifikation .....	51
3.1.1	Zusammensetzung und Beschreibung der Studiengruppe .....	51
3.1.2	Zusammensetzung der MPN-Kontrollgruppe.....	55
3.1.3	Zusammensetzung der MDS-Kontrollgruppe.....	56
3.2	<i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse.....	57
3.2.1	Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA.....	57
3.2.2	Ergebnisse der Studiengruppe .....	58
3.2.3	Ergebnisse der Kontrollgruppen .....	61
3.3	Statistische Auswertung der <i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse .....	63
3.3.1	Diagnostische Aussagekraft der <i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse .....	63
3.3.2	Korrelation mit der Knochenmarksmorphologie.....	63
3.3.3	Korrelation mit klinischen Parametern und Zytogenetik.....	64
3.3.4	Auswirkungen auf AML-Transformation und Überlebensraten .....	65
3.4	<i>JAK2</i> -Mutationsanalyse.....	67
3.4.1	Ergebnisse der <i>JAK2</i> -Mutationsanalyse .....	67
3.4.2	Beschreibung der <i>JAK2</i> -positiven CMML-Fälle .....	69
3.5	Assoziierte systemische Mastozytose .....	69
4.	Diskussion .....	70
4.1	<i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse.....	70
4.1.1	<i>SRSF2</i> -Mutationsnachweis aus FFPE-Knochenmarksbiopsien ...	70
4.1.2	<i>SRSF2</i> -Mutationsfrequenz bei der CMML.....	71
4.1.3	RFLP-Analyse als <i>SRSF2</i> -Mutationsnachweis.....	72

4.1.4	Die Rolle von <i>SRSF2</i> -Mutationen bei der Pathogenese der CMML.....	72
4.1.5	<i>SRSF2</i> -Mutationsfrequenz in den Kontrollgruppen.....	73
4.2	<i>SRSF2</i> -Mutationsstatus .....	74
4.2.1	Korrelation des <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus mit klinischen Parametern und Zytogenetik .....	74
4.2.2	Korrelation des <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus mit der Knochenmarksmorphologie .....	75
4.2.3	Korrelation des <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus mit der Überlebensrate .	75
4.3	Diagnostischer Nutzen der <i>SRSF2</i> -Mutationsanalyse.....	76
4.3.1	Klinische und histologische Klassifikation.....	76
4.3.2	<i>SRSF2</i> -Mutationsnachweis in der CMML-Diagnostik .....	77
4.3.3	Nutzen der RFLP-Analyse in der Diagnostik .....	79
4.3.4	Grenzfälle zwischen der CMML und der präfibrotischen PMF .....	80
4.4	<i>JAK2</i> -Mutationsanalyse.....	80
4.4.1	<i>JAK2</i> -Mutationsfrequenz in der Studiengruppe .....	80
4.4.2	Einfluss von <i>JAK2</i> -Mutationen auf den Krankheitstyp und die Knochenmarksmorphologie .....	81
4.4.3	<i>JAK2</i> -Mutationsanalyse in den Kontrollgruppen .....	82
4.5	Assoziierte systemische Mastozytose .....	83
4.5.1	<i>KIT</i> -Mutationsanalyse .....	83
4.5.2	<i>SRSF2</i> - und <i>JAK2</i> -Mutationsanalyse der Mastozytose-Fälle .....	83
4.6	Schlussfolgerung.....	85
5.	Zusammenfassung .....	87
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Erklärungen zum Eigenanteil .....	99
8.	Veröffentlichungen.....	101

9. Danksagung..... 101

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Multiplex-Kontroll-PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA.....	43
Tabelle 2: <i>SRSF2</i> -PCR .....	45
Tabelle 3: Cycle-Sequencing-Reaktion .....	47
Tabelle 4: Zusammensetzung der CMML-Studiengruppe .....	52
Tabelle 5: Zytogenetik der CMML-Patienten .....	52
Tabelle 6: Tabellarische Übersicht über die <i>SRSF2</i> -Mutationen in der CMML-Gruppe und den Kontrollgruppen .....	62
Tabelle 7: Vierfeldertafel zur Berechnung der Parameter zur Abschätzung der Aussagekraft von Testverfahren.....	63
Tabelle 8: Tabellarische Übersicht über Patienteneigenschaften, Blutbild und Zytogenetik im Verhältnis zum <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus in der CMML-Gruppe	65
Tabelle 9: Tabellarische Übersicht über Transformation in AML, Follow-up und Überlebensraten im Verhältnis zum <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus in der CMML-Gruppe .....	66
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des <i>JAK2</i> -Mutationsstatus in Abhängigkeit des <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus in der CMML-Gruppe.....	67
Abbildung 1: Die Zellen der Hämatopoese .....	13
Abbildung 2: Schema der myeloischen Neoplasien .....	14
Abbildung 3: Diagnosekriterien für die chronisch myelomonozytäre Leukämie	20
Abbildung 4: Blutausstrich bei einer CMML-1.....	23
Abbildung 5: Knochenmarksbiopsie eines Patienten mit CMML .....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Spleißvorgangs. ....	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung zu Beginn der Bildung des Spleißosoms.....	28
Abbildung 8: Verteilung der verschiedenen Mutationen in <i>SRSF2</i> in vorangegangenen Studien. ....	28
Abbildung 9: Schematisch Darstellung der Restriktionsstellen von BsaJI bei Wildtyp-Basenfolge im Kodon 95. ....	31

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Restriktionsstellen von BsaJI bei der Mutation p.P95H. ....	32
Abbildung 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten .....	53
Abbildung 12: Chloracetatesterase-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten mit <i>SRSF2</i> -Mutation .....	54
Abbildung 13: CD14-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten mit <i>SRSF2</i> -Mutation .....	54
Abbildung 14: Knochenmarkshistologie eines CMML-Patienten mit Mastzellinfiltraten.....	55
Abbildung 15: Knochenmarkshistologie eines Patienten mit einer präfibrotischen PMF mit Monozytose.....	56
Abbildung 16: Gelelektrophorese nach PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA .....	57
Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der maximalen Amplifizierbarkeit der untersuchten DNA-Proben .....	58
Abbildung 18:Elektropherogramm des Kodon 95 (rote Markierung) nach Kapillarelektrophorese im GenomeLab GeXP Sequenzer im Falle der <i>SRSF2</i> -Wildtyp-Sequenz im Kodon 95 (CCC) (A) und im Falle der p.P95L-Mutation (B). .....	59
Abbildung 19: Verteilung der Mutationen im <i>SRSF2</i> -Kodon 95 in der Studiengruppe .....	60
Abbildung 20: Gelelektrophorese nach BsaJI-Verdau .....	61
Abbildung 21: : RFLP-Analyse bei 16 MDS-Patienten .....	62
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensraten in Abhängigkeit vom <i>SRSF2</i> -Mutationsstatus (n = 28) .....	66
Abbildung 23: <i>JAK2</i> -Schmelzpunktanalyse .....	68

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A	Alanin
A	Adenin
aCML	Atypische Chronisch myeloische Leukämie
al	aliter
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ASXL1	Additional sex combs like 1
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMML	Chronisch myelomonozytäre Leukämie
CNL	Chronische Neutrophilenleukämie
CPSS	CMML-specific prognostic scoring system
D	Asparaginsäure
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequencing
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Essentielle Thrombozythämie
F	Phenylalanin
FAB	French-American-British Cooperative Leukemia Group
FFPE	Formalin-fixed, Paraffin-embedded

<i>FGFR1</i>	Fibroblast growth factor receptor 1
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
H	Histidin
Hb	Hämoglobin
HLA	Human Leukocyte Antigen
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
l	Liter
L	Leucin
LiCl	Lithiumchlorid
LNA	Locked nucleic acid
M	Molar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS/MPN	Myelodysplastisch/myeloproliferatives Syndrom
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
mM	Millimolar
MPN	Myeloprolifertive Neoplasie
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	messenger RNA
mut	mutiert
n	Anzahl
n	nicht definierte Base
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nM	Nanomolar

P	Prolin
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>PDGFRA</i>	Platelet-derived growth factor receptor A
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor B
pH	potenti Hydrogenii
PK	Positivkontrolle
pM	Picomolar
PMF	Primäre Myelofibrose
pmol	Pikomol
PV	Polycythämia vera
R	Arginin
RA	Refraktäre Anämie
RAEB	Refraktäre Anämie mit Exzess an Blasten
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie
RCUD	Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
SM-AHNMD	Systemische Mastozytose mit assoziierter klonaler hämatologischer Nicht-Mastzellerkrankung
SM-CMML	Systemische Mastozytose mit assoziierter chronisch myelomonozytärer Leukämie
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein
SPRI <sup>®</sup>	Solid Phase Reversible Immobilization
<i>SRSF2</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 2
T	Threonin
T	Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA

<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Valin
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

# 1. Einleitung

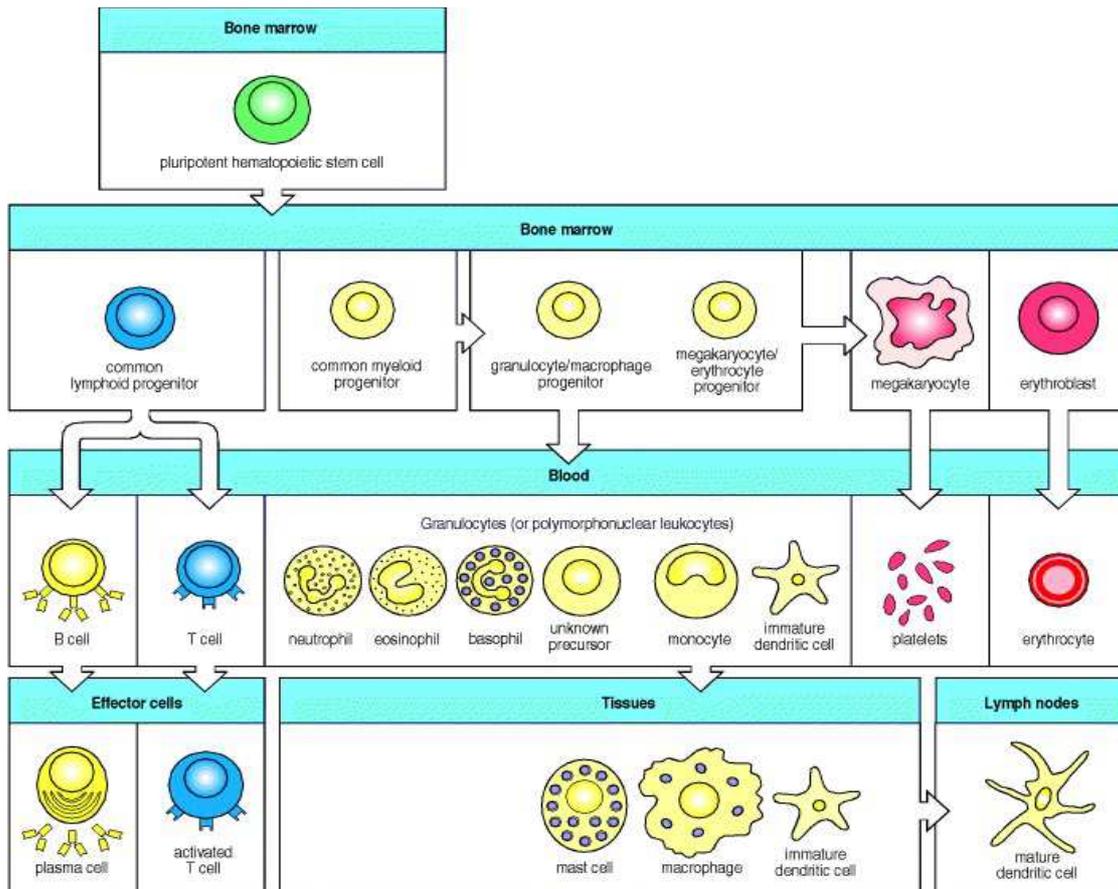
## 1.1 Maligne Erkrankungen des Knochenmarks

### 1.1.1 Grundlagen zur Hämatopoese und assoziierten Neoplasien

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung einer Methode, die molekularpathologisch zur Diagnostik der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML) beitragen soll[1]. Der Nachweis von Mutationen im *Serin-Arginin-rich-splicing-factor-2*-Gen (*SRSF2*) aus Knochenmarksbiopsien soll dabei helfen, die Diagnose CMML zu stellen und die Krankheit von anderen hämatologischen Neoplasien abzugrenzen[1].

Die CMML ist eine klonale und maligne Erkrankung der Hämatopoese, des blutbildenden Systems des menschlichen Körpers[2]. Eingeteilt werden diese Erkrankungen nach der aktuellen WHO-Klassifikation der Tumoren der hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe aus dem Jahr 2008[2].

Die Hämatopoese des erwachsenen Menschen findet physiologisch im Knochenmark statt[3]. Hier entstehen aus pluripotenten Stammzellen durch Teilung und Differenzierung die verschiedenen Zellen des menschlichen Blutes[3]. Im Allgemeinen kann man die Hämatopoese in eine lymphatische und eine myeloische Reihe einteilen[3]. Aus den myeloischen Stammzellen entstehen die Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten, Mastzellen, die dendritischen Zellen sowie Thrombozyten[3]. Aus den lymphatischen Stammzellen entstehen B- und T-Lymphozyten sowie die NK-Zellen (Abbildung 1)[3].



**Abbildung 1: Die Zellen der Hämatopoese**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung, wie im Knochenmark aus einer gemeinsamen Stammzelle zunächst eine lymphoide und eine myeloische Stammzelle entstehen. Daraus entstehen dann in weiteren Teilungsschritten die verschiedenen Zellen der Hämatopoese.

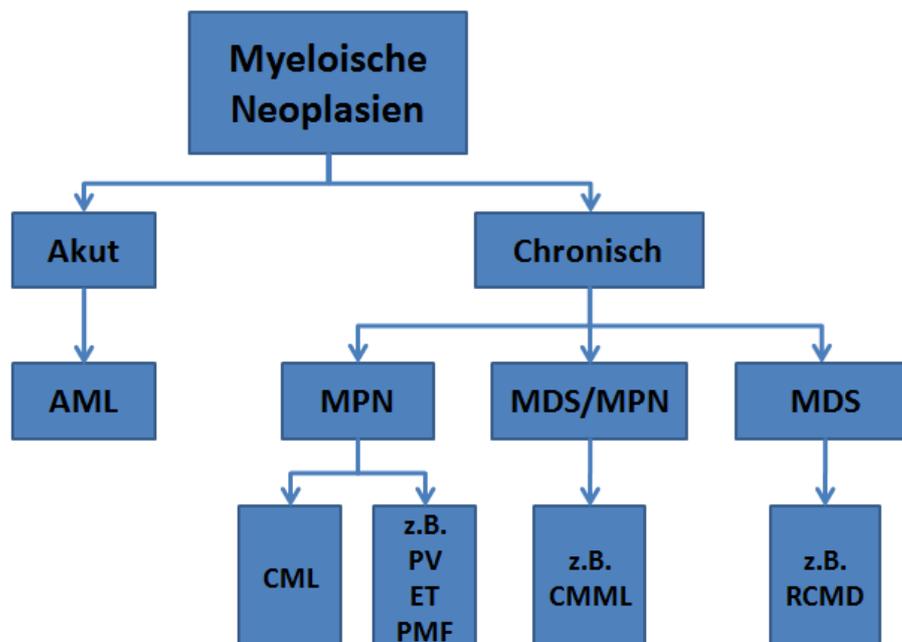
Quelle: [3]

Prinzipiell kann es während allen Differenzierungsstufen der Hämatopoese zur malignen Entartung kommen, die daraus resultierenden Krankheitsbilder unterscheiden sich demnach in Abhängigkeit ihrer Ursprungszellen[4]. Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems sind beispielsweise die bei Kindern häufig auftretende akute lymphatische Leukämie (ALL), die Lymphome und das Multiple Myelom (MM)[4].

Erkrankungen der myeloischen Reihe werden nach ihrem klinischen Verlauf in akute und chronische Erkrankungen eingeteilt (Abbildung 2)[4]. Zu den akut verlaufenden Erkrankungen gehört insbesondere die akute myeloische Leukämie (AML)[4]. Bei dieser findet die neoplastische Transformation auf der Ebene einer eher unreifen myeloischen Vorläuferzelle statt[5]. Dadurch kommt

es zur unkontrollierten autonomen Proliferation von Blasten, welche nicht nur die normale Hämatopoese im Knochenmark verdrängen, sondern auch ins periphere Blut ausgeschwemmt werden und Organe infiltrieren können[5]. Durch ihren aggressiven Verlauf ist eine rasche Chemotherapie oder gegebenenfalls eine Stammzelltransplantation erforderlich[6].

Zusätzlich zu der häufigeren primären Form, kann die AML auch sekundär, als Ausdruck einer Progression, aus anderen Erkrankungen der Hämatopoese entstehen[4,6,7]. Hierfür kommen die meisten chronisch myeloischen Neoplasien in Frage[4,6,7].



**Abbildung 2: Schema der myeloischen Neoplasien**

Stark vereinfachtes Schema über die verschiedenen myeloischen Neoplasien, erstellt anhand der WHO-Klassifikation[4].

AML: Akute myeloische Leukämie; MPN: Myeloproliferative Neoplasien; MDS/MPN: myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien; MDS: Myelodysplastische Syndrome; CML: Chronisch myeloische Leukämie; PV: Polycythämia vera; ET: Essentielle Thrombozythämie; PMF: Primäre Myelofibrose; CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; RCMD: Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie

### 1.1.2 Myeloproliferative Neoplasien

Die chronisch verlaufenden Neoplasien der myeloischen Stammzellen werden in der WHO-Klassifikation weiter unterteilt (Abbildung 2)[4]. Eine Gruppe von Erkrankungen wird in der WHO-Klassifikation als myeloproliferative Neoplasien (MPN) zusammengefasst (Abbildung 2)[4]. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe klonaler Stammzellerkrankungen, deren gemeinsames Charakteristikum eine über den Bedarf hinausgehende Proliferation ausreifender Blutzellen ist[4]. Hauptvertreter und mit einer weltweiten Inzidenz von 1-2 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr[5] die häufigste der myeloproliferativen Neoplasien ist die chronisch myeloische Leukämie (CML)[5]. Im Vergleich zur AML stammen die Tumorzellen bei der CML von einer eher reiferen, pluripotenten Stammzelle ab[5]. Durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, der so genannten Philadelphia-Translokation, entsteht das *BCR-ABL*-Fusionsgen, welches für eine gleichnamige Tyrosinkinase codiert[5,8]. Diese ist durch die Aktivierung über den BCR-Promoter konstitutiv aktiviert, wodurch die Apoptose der Tumorzellen gehemmt wird[8]. In ihrer ersten, chronisch stabilen Phase bleibt die CML meist über Jahre klinisch stumm und wird oft nur zufällig im Rahmen einer Blutuntersuchung entdeckt[5,8]. Vermutlich durch weitere erworbene genetische Defekte der Tumorzellen geht die Erkrankung in eine Akzelerationsphase über[6]. Durch massive Proliferation und Ausschwemmung unreifer Blasten kann es zur Blastenkrise kommen, deren klinisches Bild mit dem einer akuten Leukämie vergleichbar ist[6,8].

Ebenso zu den chronisch myeloproliferativen Neoplasien zählt die WHO die Polycythämia vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Primäre Myelofibrose (PMF) (Abbildung 2)[4]. Sie haben gemeinsam, dass Mutationen des *JAK2*-Gens in hohem Maße identifiziert werden und es bei allen Erkrankungen zumindest initial zu einer abnormen Proliferation einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen im Knochenmark kommt[4,6]. Im peripheren Blut findet man dann meist auch eine erhöhte Anzahl in der Regel funktionstüchtiger Zellen[6]. So kommt es zum Beispiel bei der PV vor allem zu einem Anstieg der Erythrozyten, des Hämoglobins und des Hämatokrits[6]. Dies

führt häufig zu thromboembolischen Komplikationen, welche einen Großteil der klinischen Komplikationen der PV darstellen[4,6,9].

Da auch die Mastzellen, bevor sie sich in verschiedensten Geweben ansiedeln, ursprünglich aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark reifen, zählt die WHO-Klassifikation auch die Formen der Mastozytose zu den MPN[4]. Zusätzlich dazu enthält die Gruppe der MPN noch weitere, eher seltenere Erkrankungen, die hier nicht weiter erwähnt werden sollen[3,4].

### 1.1.3 Myelodysplastische Syndrome

Eine weitere große Gruppe an Krankheitsentitäten fasst die WHO-Klassifikation unter dem Überbegriff der Myelodysplastischen Syndrome (MDS) zusammen[4]. Dies sind ebenfalls klonale Stammzellerkrankungen der myeloischen Hämatopoese[4]. Kennzeichnend für die MDS sind zahlreiche dysplastische Veränderungen einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen im Knochenmark[10]. Durch die Dysplasie kommt es zu ineffektiver Hämatopoese, welche zu peripheren Zytopenien führt[6,10]. Das Knochenmark stellt sich normal bis hyperzellulär dar[11]. Ist nur eine Zellreihe betroffen, spricht man von Refraktärer Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD), zum Beispiel im Falle der Erythropoese von Refraktärer Anämie (RA) mit einem erniedrigten Hämoglobinwert[10,12]. Ebenso kann die Dysplasie aber zwei oder alle drei myeloischen Zellreihen betreffen (Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)), wodurch es zur Anämie, Neutropenie und Thrombopenie kommen kann[10,12].

### 1.1.4 Myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien

Zusätzlich zu den genannten Gruppen gibt es einige hämatologische Neoplasien, die sowohl Zeichen eines myelodysplastischen Syndroms als auch einer myeloproliferativen Neoplasie zeigen[4]. Daher benennt die WHO-Klassifikation zusätzlich die Gruppe der myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN)[4]. Diese Neoplasien zeigen Zeichen der MDS wie Dysplasien oder Zytopenien[13]. Gleichzeitig kommt es aber auch regelmäßig zu peripheren Zellzahlerhöhungen oder klinischen Symptomen wie

Splenomegalie, was eher Charakteristika der MPN sind[13]. In diese Gruppe gehört die CMML, die atypische, *BCR-ABL*-negative CML (aCML), die juvenile myelomonozytäre Leukämie(JMML) und die unklassifizierbaren MDS/MPN[13-15].

## **1.2 Die Chronisch myelomonozytäre Leukämie - Grundlagen zur Erkrankung**

### 1.2.1 Epidemiologie

Die CMML ist eine seltene Erkrankung. Besonders weil die CMML schwierig zu diagnostizieren und oftmals nicht genau von Differentialdiagnosen abgegrenzt werden kann, existieren keine eindeutigen Daten zur Inzidenz[16]. Bei Personen über 60 Jahren wird sie mit 3/100000/Jahr angegeben[13], über alle Altersgruppen verteilt soll sie bei etwa 0,5/100000/Jahr liegen[15]. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 65 und 75 Jahren, die Krankheit tritt etwa doppelt so häufig bei Männern auf[14,16,17].

### 1.2.2 Klinik

Die klinischen Symptome sind vielfältig und unspezifisch, sowohl klassische Symptome der MPN als auch der MDS können vorkommen[18]. Allgemein häufig sind B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust[14]. Durch zu niedrige oder funktionslose Leukozyten kann es zu Infektionen, im Falle einer Anämie zu Abgeschlagenheit und Müdigkeit kommen[14,15]. Thrombozytopenie kann zur Blutungsneigung führen, ebenso kann es durch Thrombozytose auch zu einer erhöhten Thromboseneigung kommen[15]. Ein weiteres häufiges Symptom ist auch die Spleno- und/oder Hepatomegalie, die bei 30-40% der Patienten vorkommt[15,19-21]. Es wird angenommen, dass ein Großteil der Patienten eher zufällig im Rahmen von Blutuntersuchungen entdeckt wird[15,16]. Lymphadenopathie ist bei der CMML eher selten, kann aber vorkommen[14,19].

### 1.2.3 Subgruppen der Erkrankung, Prognose

Aufgrund der vielfältigen Manifestationsformen der CMML, wurden verschiedene Unterteilungskriterien entwickelt, die zur Abschätzung der Prognose und zur Therapieentscheidung hilfreich sein sollen[16]. So unterteilte die French-American-British Cooperative Leukemia Group (FAB) die CMML in eine myeloproliferative (CMML, MPN-type) und eine myelodysplastische (CMML, MDS-type) Unterform[20,22]. Das Entscheidungskriterium hierfür ist die Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut, ab einer Gesamtzahl über  $13 \times 10^9/l$  spricht sie vom MPN-Typ, darunter vom MDS-Typ[20,22]. Die aktuelle WHO-Klassifikation unterteilt die CMML in zwei Untergruppen, ausgerichtet an der Anzahl an Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark[14]. Sie spricht von CMML-1 bei einem Blastenanteil (inklusive Promonozyten) von unter 5% im Blut und unter 10% im Knochenmark[14]. Die Diagnose CMML-2 soll gestellt werden, wenn der Blastenanteil (inklusive Promonozyten) im peripheren Blut bei 5-19%, im Knochenmark bei 10-19% liegt[14].

Die Gesamtüberlebensrate wird mit durchschnittlich 20-40 Monaten angegeben, kann allerdings stark variieren und ist von vielen Parametern abhängig[14]. Um die Prognose einzelner Patienten individuell einschätzen zu können, wurden zahlreiche Scoring-Systeme entwickelt[1,16]. Ältere orientieren sich vor allem an klinischen Daten, Blutparametern und Blastenzahl (MD Anderson prognostic score[20]; Düsseldorf Score[23]). Neuere beinhalten zum Teil noch weitere Daten wie zum Beispiel Zytogenetik (CMML-specific scoring system, CPSS[24]) oder molekulare Veränderungen[25]. Die Erforschung der Bedeutung neuer molekularer Marker für die Prognose ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten[25-27].

Im Rahmen einer Progression kann sich aus einer CMML eine sekundäre AML entwickeln[14]. Dies verschlechtert die Prognose und verkürzt die zu erwartende Überlebenszeit[14]. Oft ist ein Übergang in eine AML auch die Todesursache[28]. Die Wahrscheinlichkeit für eine Transformation in eine AML ist sehr variabel und vom Subtyp der Erkrankung abhängig[14,16]. Die WHO-Klassifikation gibt eine Transformationsrate von 15-30% an[14], neuere

Übersichtsarbeiten nennen Wahrscheinlichkeiten von 20-30%[29] oder 15-52%[16]. Auch hier existieren Scoring-Systeme, die es erleichtern sollen, die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in eine AML abzuschätzen[24]. Die Diagnose AML ist über einen Anteil an Blasten von über 20% in peripherem Blut oder Knochenmark definiert[14]. Daher ist eine hoher Blastenanteil auch ein unumstrittener Risikofaktor für eine Transformation in eine AML und eine schlechtere Prognose[14,24].

#### 1.2.4 Therapie

Die Therapie für Patienten mit CMML ist vielschichtig und außerdem stark vom Alter, den individuellen Risikofaktoren und der erwarteten Prognose anhängig, ein universell einsetzbares Therapieschema existiert nicht[18].

Die supportive Therapie beinhaltet zum Beispiel Bluttransfusionen oder die Gabe von Erythropoetin bei symptomatischer Anämie[16,18]. Eine Infektionsprophylaxe sollte vollzogen werden, bei sehr niedrigen Leukozytenzahlen kann die Gabe von G-CSF erwogen werden[16,18]. Bei einer hohen Anzahl von Blasten (z.B. >10%) oder massiver Organomegalie kann eine zytoreduktive Therapie mit Hydroxyurea hilfreich sein[16,18].

Bei Patienten mit mittlerem oder höherem Risikoprofil kann zusätzlich eine Chemotherapie versucht werden, sofern die Patienten bezüglich ihres biologischen Alters und ihrer Komorbiditäten dafür geeignet sind[16,18]. Der DNA-Methylierungshemmer Azacitidin wird bei der CMML eingesetzt[16,18]. Verschiedene Studien zeigten Ansprechraten von 25-70%[16,18]. Klassische zytotoxische Chemotherapieregime finden bei der CMML Anwendung, wenn sich eine sekundäre AML entwickelt hat[16]. Immunmodulatorische Substanzen, wie zum Beispiel Lenalidomid, befinden sich in Erprobung[18].

Die einzig kurative Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation, aufgrund der teilweise schwerwiegenden Komplikationen sollte die Stammzelltransplantation nur nach sorgfältiger Abwägung der Nutzen und Risiken durchgeführt werden[16,18]. Sie kommt eher bei jüngeren Patienten mit hohem Risikoprofil zum Einsatz[16,18].

## 1.3 Die chronisch myelomonozytäre Leukämie - Diagnostik

### 1.3.1 Diagnosekriterien

Die WHO-Klassifikation gibt fünf Kriterien vor, die erfüllt sein müssen, um die Diagnose CMML stellen zu können[14] (Abbildung 3).

### Diagnosekriterien für die chronisch myelomonozytäre Leukämie

1. **> 1 x 10<sup>9</sup> Monozyten pro Liter im peripheren Blut; persistierend**
2. **Kein Philadelphia-Chromosom oder *BCR-ABL1*-Fusionsgen**
3. **Kein Rearrangement von *PDGFRA* oder *PDGFRB***
4. **< 20% Blasten (Myeloblasten, Monoblasten und Promonozyten) im peripheren Blut im Knochenmark**
5. **Dysplasie in einer oder mehrerer myelischer Zellreihen**  
*Im Falle von fehlender oder minimaler Dysplasie kann die Diagnose CMML auch gestellt werden falls:*
  - *eine erworbene, klonale zytogenetische oder molekulargenetische Veränderung in den hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden kann*
  - *oder die Monozytose über mindestens 3 Monate persistiert*
  - *und alle anderen Ursachen für Monozytose ausgeschlossen werden*

Abbildung 3: Diagnosekriterien für die chronisch myelomonozytäre Leukämie  
Modifiziert nach der WHO-Klassifikation[11].

Als erstes Kriterium ist eine Anzahl von >1 x 10<sup>9</sup> Monozyten pro Liter im peripheren Blut gefordert[14]. Die absolute Monozytose sollte persistent sein, ein einmaliger Befund sollte nachkontrolliert werden[14].

Das zweite Kriterium schließt das Vorhandensein eines Philadelphia-Chromosoms, beziehungsweise des *BCR-ABL1*-Fusionsgens aus[14,16]. Dadurch wird die CMML von der CML abgegrenzt[14,16].

Insbesondere in Fällen mit Eosinophilie im Blut, sollte das *PDRGFA*-, *PDGFRB*- und das *FGRF1*-Rearrangement ausgeschlossen werden, da Erkrankungen mit Eosinophilie und einer dieser molekularpathologischen Veränderungen eine eigene Gruppe von Neoplasien in der WHO-Klassifikation darstellen[14,30].

Als viertes Kriterium ist eine Anzahl von weniger als 20% Blasten in Blut und Knochenmark vorgegeben, da sonst die Diagnose AML gestellt werden müsste[13,14]. Auch die Myeloblasten, Monoblasten und Promonozyten werden zu den Blasten gezählt[14].

Das fünfte Kriterium gibt das Vorhandensein von Dysplasie in einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen vor[14]. Im Falle fehlender oder minimaler Dysplasie kann die Diagnose trotzdem gestellt werden[14]. Zum einen bei Vorhandensein einer klonalen genetischen Abnormalität der hämatopoetischen Zellen, zum anderen, falls die Monozytose länger als drei Monate persistiert[14]. In beiden Fällen müssen alle anderen Ursachen für eine Monozytose ausgeschlossen werden[14].

### 1.3.2 Differentialdiagnosen und diagnostische Problematik

Sowohl klinisch, histologisch, zytogenetisch oder molekularpathologisch gibt es keinen Befund, der die Diagnose CMML beweist, sie ist somit immer als Zusammenschau aller Befunde zu sehen und oft auch erst nach Ausschluss aller Differentialdiagnosen zu stellen[1,16,18].

Immer auszuschließen ist in jedem Fall eine AML, dies muss durch Quantifizierung der Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark geschehen[14].

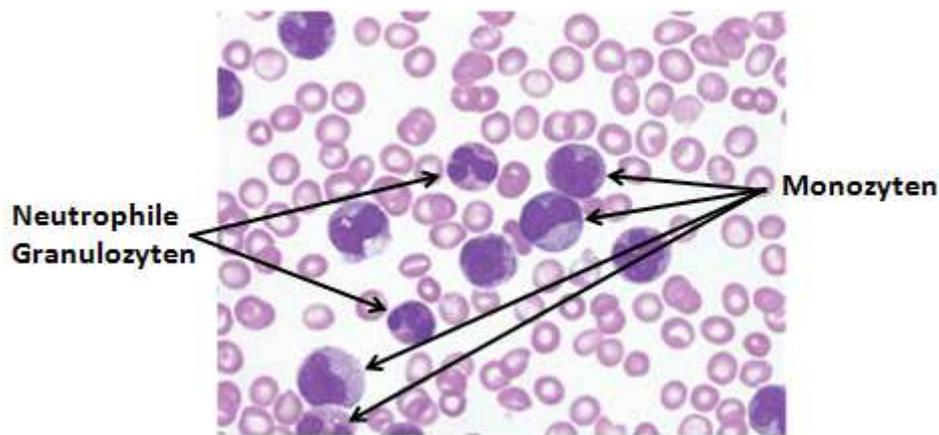
Das erste Diagnosekriterium, die periphere Monozytose, ist einer der Hauptbefunde bei der CMML[14]. Sie ist aber keineswegs beweisend für eine CMML, sie kann zahlreiche andere Ursachen haben[15]. Zum einen gibt es zahlreiche nicht-maligne Ursachen für eine Monozytose, zum Beispiel Infektionen, Bindegewebserkrankungen oder Sarkoidose[15,16]. Zum anderen kann es auch bei anderen myeloischen Neoplasien zu einer Erhöhung der absoluten Monozytenzahl kommen[15,16]. Häufig ist dies bei der CML der Fall, diese kann durch den Nachweis der *BCR-ABL1*-Translokation abgegrenzt werden[16]. Schwieriger ist es bei der atypischen, *BCR-ABL*-negativen CML (aCML) [15]. Im Gegensatz zur CMML haben die Monozyten bei der aCML aber einen deutlich kleineren Anteil an der Gesamtleukozytenzahl, selten über 10%[31]. Aus der Gruppe der MPN ist die PMF, vor allem in der präfibrotischen

Phase, oft eine sehr schwierige Differentialdiagnose, da auch Patienten mit PMF eine Monozytose entwickeln können[1,15,32]. Hilfreich bei der Differenzierung zwischen CMML und PMF ist insbesondere die Knochenmarkshistologie und in geringem Maße auch der Nachweis der *JAK2*-Mutation[1,15]. Ein weiteres Diagnosekriterium ist die Dysplasie[14]. Insbesondere in Fällen, bei denen die Dysplasie sehr ausgeprägt ist, kann es schwierig sein, die CMML von manchen MDS wie zum Beispiel der RCMD abzugrenzen[15]. Durch die Dysplasie kann es zur Leukopenie kommen, wodurch selbst bei einem hohen Anteil an Monozyten die absolute Monozytenzahl von  $1 \times 10^9$  möglicherweise nicht erreicht wird[18].

### 1.3.3 Blutbild und Blutausstrich

Die charakteristische und durch die Diagnosekriterien für die CMML definitionsgemäß vorhandene Blutbildveränderung ist die absolute Monozytose im peripheren Blut, mehr als  $1 \times 10^9$  Monozyten pro Liter[14]. Die Werte bewegen sich im Mittel zwischen  $2-5 \times 10^9/l$  [14], es wurden aber auch Werte bis 162, bzw.  $221 \times 10^9/l$  beschrieben[20,33]. Die Gesamtzahl an Leukozyten ist ebenfalls sehr variabel[14]. Zusätzlich zur Monozytose kann eine Neutrophilie zu massiv erhöhten Leukozytenwerten führen[14]. Ebenso sind aber auch erniedrigte Leukozytenwerte durch Neutropenie möglich[14]. Im Mittel liegt die Gesamtzahl der weißen Blutzellen zwischen  $10$  und  $20 \times 10^9/l$ [15]. Die Monozyten haben in der Regel einen Anteil von über 10% an der Gesamtzahl[16]. Typisch für die CMML ist außerdem eine milde Baso- und Eosinophilie[14]. Zusätzlich zu Veränderungen des weißen Blutbildes zeigen Patienten oft eine milde Thrombozytopenie sowie eine leichte Anämie[14].

Im Blutausstrich sehen die meisten Monozyten reif aus, es können aber auch so genannte atypische Monozyten vorhanden sein[14] (Abbildung 4). Dysplasie kann in allen Zellreihen sichtbar sein, oft sind dysplastische Neutrophile zu sehen[14] (Abbildung 4). Zudem kann es zu einer Vermehrung von Vorläuferzellen kommen[14]. Die Anzahl an Blasten liegt meist unter 5%[14]. Bei einem Anteil von 5-19% muss Diagnose CMML-2, bei über 20% die Diagnose AML gestellt werden[14,34].



**Abbildung 4: Blutausstrich bei einer CMML-1**  
 Die Anzahl an Leukozyten ist erhöht, die Monozyten sind vorherrschend; die neutrophilen Granulozyten zeigen Dysplasiezeichen. Modifiziert aus [15].

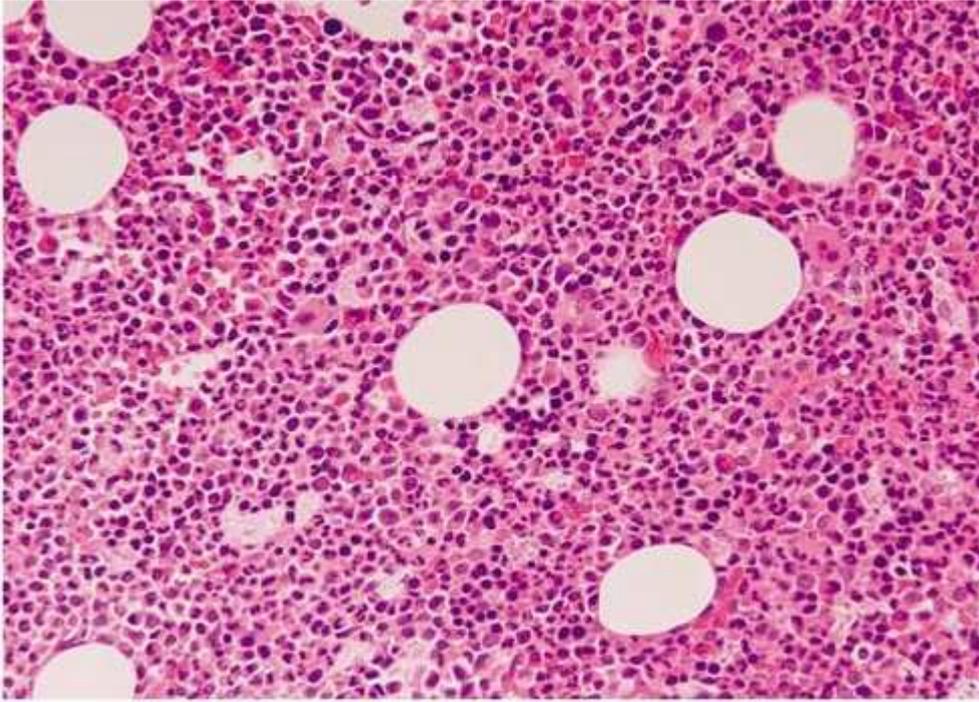
#### 1.3.4 Histologie und Immunhistochemie

Zur Diagnosestellung der CMML ist eine Untersuchung des Knochenmarks notwendig[1,18]. Im Vergleich zur Knochenmarksaspiration mit anschließender zytologischer Untersuchung, liefert die histologische Untersuchung einer Stanzbiopsie noch zusätzlich wichtige Informationen über die genaue topographische Verteilung der Hämatopoeselemente, die Architektur und Zusammensetzung des Stromas oder die genaue Lokalisation von Infiltraten[35]. Insbesondere in Fällen von Knochenmarksfibrose und leerem Mark ("punctio sicca") ist die Biopsie unerlässlich und sollte daher bei allen Patienten mit Verdacht auf CMML durchgeführt werden[18,35].

Das Knochenmark zeigt einige charakteristische Veränderungen bei der CMML, es gibt aber keine Veränderung, die pathognomonisch für die CMML ist[1,16,36]. Eine der Hauptauffälligkeiten des Knochenmarks von Patienten mit CMML ist die deutliche Hyperzellularität, wie sie in mehr als 75% der Fälle vorhanden ist[14] (Abbildung 5). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Knochenmark als hyperzellulär bezeichnet, wenn die Zellularität größer als 100 minus Lebensalter des Patienten war.

Die vorherrschende Zellreihe ist meist die Granulopoese, welche auch oft Zeichen der Dysplasie zeigt[14]. Die Erythropoese ist dahingegen oft verhältnismäßig vermindert, gelegentlich dysplastisch[14,16,37]. In den meisten Fällen finden sich auch deutliche Veränderungen bei den Megakaryozyten,

sowohl Mikromegakaryozyten als auch Megakaryozyten mit abnormer Kernstruktur können vorkommen, ihre Anzahl kann vermehrt, vermindert oder normal sein[13,14,37] (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Knochenmarksbiopsie eines Patienten mit CMML**  
Die Hyperzellularität ist deutlich sichtbar.  
Quelle: [13]

Bei der CMML spielen auch zahlreiche immunhistochemische Färbungen eine wichtige Rolle[14]. So helfen zum Beispiel die CD14 und die CD68-Färbung dabei, Monozyten zu identifizieren, was in konventionellen histochemischen Färbungen häufig schwierig ist[36,38,39].

Ebenso wichtig für die Klassifikation der Erkrankung ist auch die Abschätzung der Anzahl von Blasten im Knochenmark[14]. Hierfür hilfreich kann zum Beispiel die CD34-Färbung sein, allerdings sind die bei der CMML zu den Blasten gezählten Promonozyten und Monoblasten oft CD34-negativ[18,34]. Zur Hervorhebung der bei der CMML häufig vorkommenden Mikromegakaryozyten ist CD61 hilfreich[35], Mastzellen lassen sich gut mit CD117 anfärben[40].

### 1.3.5 Genetische Veränderungen

Da die Diagnosekriterien für die CMML den Ausschluss der Philadelphia-Translokation fordern, ist die zytogenetische Untersuchung erforderlich[14]. Im Gegensatz zum Beispiel zur CML gibt es aber für die CMML keine spezifische zytogenetische Veränderung[1,16]. Insgesamt kommen klonale zytogenetische Veränderungen bei der CMML in 20-40% der Fälle vor[14,20]. Häufig sind zum Beispiel eine Trisomie 8, ein Verlust des Y-Chromosoms oder eine Monosomie 7[18,25,41]. Es kommen aber auch viele weitere und zum Teil komplexe zytogenetische Aberrationen vor[14,18,20,41].

Zusätzlich zu chromosomalen Veränderungen sind mittlerweile auch zahlreiche Genmutationen bekannt, die bei der CMML vorkommen[18]. In etwa 60% der Fälle sind Mutationen in Genen entdeckt worden, die für Faktoren kodieren, die am Prozess des Spleißens beteiligt sind[29]. Beispiele hierfür sind *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSF2* sowie das bei dieser Arbeit untersuchte *SRSF2*-Gen[1,25]. Zusätzlich dazu wurden aber auch Mutationen in zahlreichen weiteren Genen gefunden, die zum Beispiel an der epigenetischen Regulation der Genexpression (z.B. *ASLX1*, *TET2*, *EZH2*, *IDH1/2*, *UTX*, *DNMT3A*), der Transkription (z.B. *TP53*, *RUNX1*, *NPM1*) oder der Signaltransduktion (z.B. *N-KRAS*, *CBL*, *JAK2*, *FLT3*) beteiligt sind[25]. Diese Mutationen kommen aber auch bei zahlreichen anderen myeloischen Neoplasien vor und sind diagnostisch unspezifisch, sodass sie lediglich richtungsweisend bei der Diagnosefindung sein können[1,18,25,42,43].

In speziellen Fällen können molekulargenetische Untersuchungen hilfreich zum Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen sein[15]. Beispielsweise sollten im Falle von Eosinophilie Rearrangements des *PDGFRA*-, *PDGFRB*- und *FGFR1*-Gens ausgeschlossen werden[14]. Ebenso kann der Nachweis einer *JAK2*-Mutation richtungsweisend sein, da diese Mutation häufig bei Patienten mit MPN gefunden wird[4], jedoch deutlich seltener bei der CMML[44].

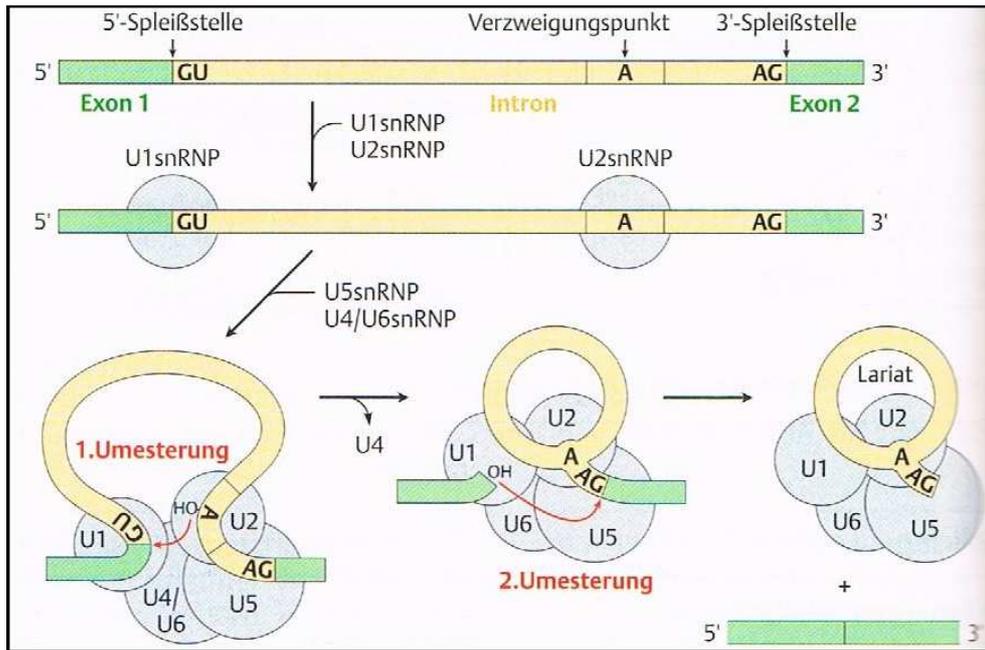
## 1.4 *SRSF2*

### 1.4.1 Funktion

*SRSF2* ist ein auf Chromosom 17 lokalisierendes Gen und kodiert für ein gleichnamiges Protein[45]. Dieses spielt eine wichtige Rolle beim Prozess des Spleißens der prä-mRNA[1,43].

Das Spleißen ist ein wichtiger Vorgang für die Genexpression in eukaryontischen Zellen[46]. Dabei werden in einem komplexen Prozess die Introns aus der prä-mRNA entfernt und so die Protein-codierende mRNA hergestellt[46]. Zusätzlich können mit Hilfe von alternativem Spleißen aus einem Genabschnitt unterschiedliche mRNAs und somit auch unterschiedliche Proteine hergestellt werden[42,46,47].

Für das Spleißen sind viele verschiedene Komponenten notwendig[46]. Zum einen sind das so genannte snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins), Komplexe aus kleinen RNA-Molekülen und Proteinen (U1, U2, U4, U5 und U6)[47]. Diese binden an verschiedenen Stellen der prä-mRNA und katalysieren den wesentlichen Teil der Umesterungsreaktionen, die zur Entfernung des Introns und die Verbindung der Exons notwendig sind[46](Abbildung 6). Zum anderen ist für den korrekten Ablauf des Spleißvorgangs eine große Anzahl an Proteinfaktoren notwendig[42,48]. Der Komplex aus prä-mRNA, snRNPs und Spleißfaktoren wird als Spleißosom bezeichnet[49].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Spleißvorgangs.**

In einer ersten Umesterungsreaktion verbindet sich eine 2'-OH-Gruppe am Verzweigungspunkt innerhalb des Introns mit der 5'-OH-Gruppe der in 5'-3'-Richtung ersten Base des Introns[46]. Dadurch entsteht eine Lassostruktur innerhalb des Introns und die 3'-OH-Gruppe des ersten Exons wird frei[46]. Diese freie OH-Gruppe verbindet sich nun mit der 5'-OH-Gruppe am Beginn des zweiten Exons, wodurch das Intron entfernt und die Exons verbunden werden[46].

Quelle: [49]

Einer dieser Spleißfaktoren ist SRSF2[45]. SRSF2 kann sowohl mit der RNA als auch mit anderen Spleißfaktoren interagieren[45,50]. So ist SRSF2 zum Beispiel an der Rekrutierung des U2-snRNPs beteiligt und dadurch notwendig für die Initiierung des Spleißvorgangs[1,43] (Abbildung 7). Außerdem scheint SRSF2 eine wichtige Rolle dabei zu spielen, ob Exons übersprungen werden, wodurch ihm eine wichtige Rolle bei der Regulation des alternativen Spleißens zugesprochen wird[42]. Zusätzlich zum Spleißvorgang soll SRSF2 auch an anderen Prozessen beteiligt, zum Beispiel dem Export der fertigen mRNA aus dem Zellkern und der Translation zum Protein[42,45,48].

## E splicing complex

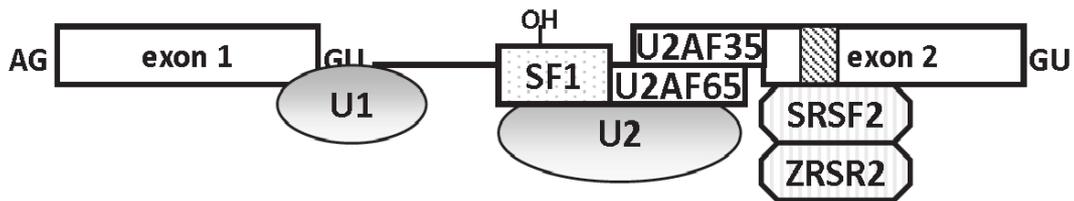


Abbildung 7: Schematische Darstellung zu Beginn der Bildung des Spleißosoms.  
Modifiziert aus [42]

### 1.4.2 Charakterisierung der Mutationen in *SRSF2*

Vorangegangene Studien entdeckten verschiedene Mutationstypen in *SRSF2*, die sich alle im selben Bereich der Gensequenz befinden[43,50-52]. Der so genannte Mutationshotspot liegt im Kodon 95 im Exon 1 des *SRSF2*- Gens auf Chromosom 17[43,50-52]. Zu über 90% handelte es sich um Punktmutationen, die zu einem Austausch der Aminosäure Prolin führen[43,50-52] (Abbildung 8). Zusätzlich wurden vereinzelt Deletionen, Insertionen und Duplikationen im Bereich des Kodon 95 gefunden[50,51].

### Verteilung der verschiedenen Mutationen in *SRSF2*

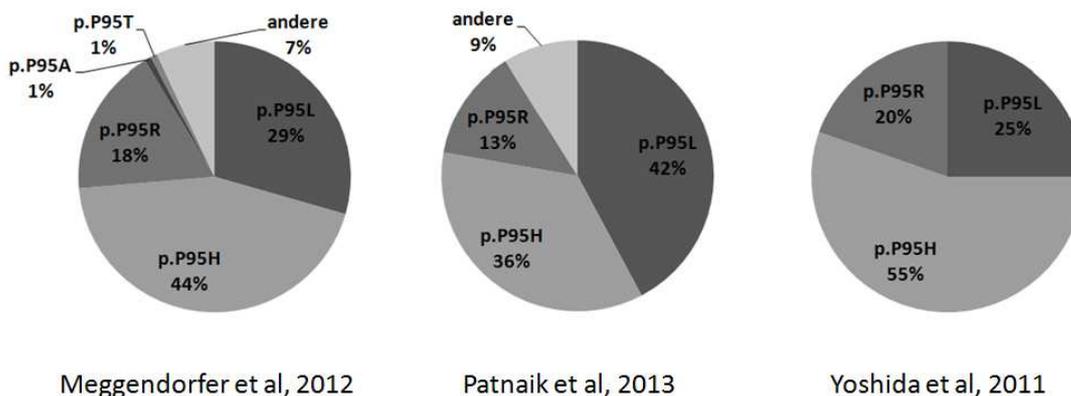


Abbildung 8: Verteilung der verschiedenen Mutationen in *SRSF2* in vorangegangenen Studien. Die Abbildung zeigt die prozentuelle Verteilung der unterschiedlichen Arten von Mutationen in *SRSF2*, wie sie in vorangegangenen Studien bei der CMML gefunden wurden. Links: Meggendorfer et al, 2012[50]; Mitte: Patnaik et al, 2013[51]; Rechts: Yoshida et al, 2011[43]

#### 1.4.3 Die Rolle von *SRSF2*-Mutationen bei der CMML

Neueren Studien zur Folge finden sich Mutationen im *SRSF2*-Gen bei bis zu 47% der Patienten mit CMML[50]. Damit gehören sie zusammen mit *ASXL1*- und *TET2*-Mutationen zu den häufigsten bei der CMML gefundenen Genmutationen[16,25]. *SRSF2*-Mutationen kommen zwar auch bei MDS oder MPN vor, jedoch mit deutlich niedrigeren Frequenzen (ca. 10-15% bei MDS[43,53,54], ca. 2% bei MPN[43]).

Studien fanden Assoziationen der *SRSF2*-Mutationen mit einem höheren Patientenalter, erhöhten Hämoglobinwerten sowie der Abwesenheit zytogenetischer Aberrationen[50]. Häufig traten *SRSF2*-Mutationen gemeinsam mit anderen Genmutationen auf, zum Beispiel mit *TET2*-Mutationen[50].

Bis jetzt konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob Mutationen im *SRSF2*-Gen bei der CMML einen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben, neuere Studien lieferten unterschiedliche Ergebnisse[25,50,51]. Dahingegen zeigten sich bei MDS und PMF Assoziationen von *SRSF2*-Mutationen mit einer schlechteren Prognose[53,55].

Die genaue pathogenetische Rolle von *SRSF2*-Mutationen bei der Entstehung einer hämatologischen Neoplasie ist derzeit Gegenstand der Forschung und noch nicht abschließend geklärt[1]. Es wird aber vermutet, dass Mutationen im *SRSF2*-Gen ein sekundäres Ereignis im Prozess der Krankheitsentstehung sind, welche zur Progression der Erkrankung zur einer malignen Neoplasie mit abnormer Differenzierung führt[1,29,56].

#### 1.4.4 Methoden zur Mutationsanalyse

Für diagnostische molekularpathologische Untersuchungen bei Patienten mit myeloischen Neoplasien wird die DNA in der Regel aus Frischmaterial gewonnen, zum Beispiel aus peripherem Blut oder Knochenmarksaspiraten[1,57]. Vorangegangene Studien verwendeten als Standardmethode zur Mutationsanalyse eine allelspezifische PCR mit anschließender bidirektionaler Sanger-Sequenzierung des Genabschnitts, der den Mutationshotspot Prolin 95 enthielt[43,50,51,54].

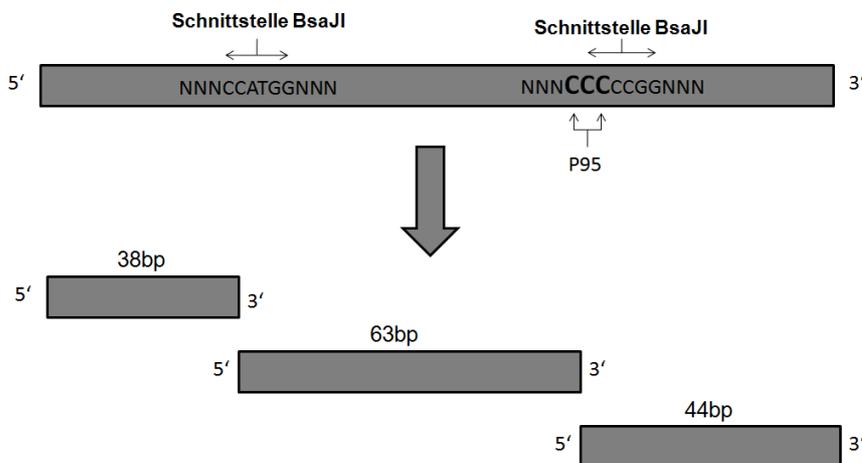
In der vorliegenden Studie wurde die Mutationsanalyse an formalinfixierten, EDTA-entkalkten Knochenmarksbiopsien durchgeführt[1]. Dieses gut konservierte Material erlaubte so die retrospektive Untersuchung archivierter Patientenproben[1]. Zusätzlich konnten dadurch Assoziationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit der Knochenmarksarchitektur untersucht werden[1].

#### 1.4.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse)

Da die Sanger-Sequenzierung ein eher aufwändiges und teures Verfahren ist, sollte in dieser Arbeit zusätzlich eine Screening-Methode etabliert werden, die die häufigsten Mutationen zuverlässig und einfach detektieren kann[1]. Hierfür wurde eine RFLP-Analyse designt und angewandt[1], deren theoretische Grundlagen im Folgenden kurz dargestellt sind.

Für diagnostische Zwecke ist es in der Regel nicht wichtig, genau zu bestimmen, welche Mutation exakt vorliegt, entscheidend ist vielmehr, ob es sich um Wildtyp- oder mutierte DNA handelt. Vorangegangene Studien zeigten, dass der Großteil der *SRSF2*-Mutationen Punktmutationen im Kodon 95 sind (vgl. 1.4.2, Abbildung 8). Dieses Kodon hat als Wildtyp-Basenfolge CCC. Das Restriktionsenzym BsaJI schneidet DNA in 5'-3'-Richtung an Stellen mit der Basenfolge CCnnGG. Das Primerdesign und die Position der Restriktionsstellen im 145 bp-langen zu amplifizierenden Produkt der vorliegenden Studie ergeben bei Wildtyp-DNA zwei Restriktionsstellen für BsaJI, eine an den Basen 38-43 und eine an den Basen 101-106. Dadurch entstehen durch den Verdau drei Fragmente mit den Längen 38 bp, 63 bp und 44 bp (Abbildung 9).

## 145bp PCR-Produkt aus *SRSF2*-Wildtyp



**Abbildung 9: Schematisch Darstellung der Restriktionsstellen von BsaJI bei Wildtyp-Basenfolge im Kodon 95. Beide Restriktionsstellen sind erhalten.**

Die drei oben beschriebenen häufigsten Mutationen p.P95H, p.P95L und p.P95R resultieren aus einer Punktmutation der mittleren Cytosinbase im Kodon 95 zu Adenin (p.P95H), Thymin (p.P95L) oder Guanin (p.P95R) [43,50-52]. Dadurch verändert sich die erste Base der zweiten Restriktionsstelle, sodass BSAJI an dieser Stelle nicht mehr schneidet. Somit entstehen beim Restriktionsverdau zwei Fragmente mit Längen von 38bp und 107bp (Abbildung 10).

## 145bp PCR-Produkt mit Mutation p.P95H

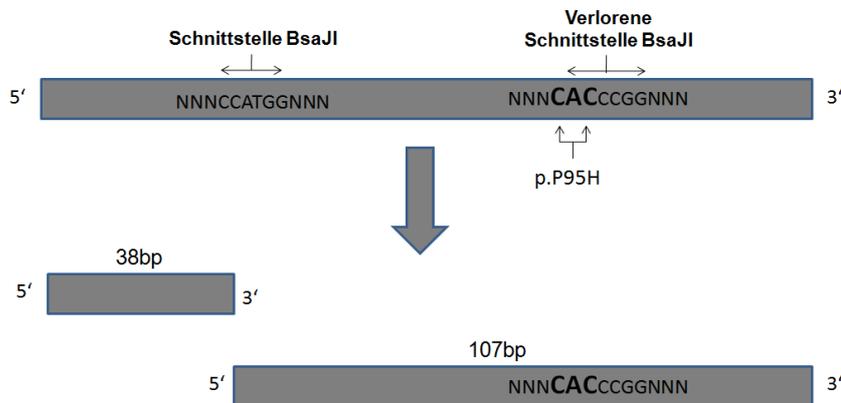


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Restriktionsstellen von BsaJI bei der Mutation p.P95H. Die zweite Restriktionsstelle ist durch die Mutation zerstört.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Detektion der *SRSF2* Mutation aus EDTA-entkalkten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien[1].

Es wurden Assoziationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit klinischen sowie hämatologischen Parametern untersucht. Ebenso sollten die Ergebnisse des *SRSF2*-Mutationsstatus mit der histologischen Morphologie der jeweiligen Biopsie verglichen werden[1]. Durch die Untersuchung des Mutationsstatus an Follow-up-Biopsien bei einigen Patienten sollte zudem das Auftreten der Mutation im Krankheitsverlauf untersucht werden um so die Rolle der Mutation bei der Pathogenese der CMML weiter diskutieren zu können[1].

Ein weiteres Ziel war die Klärung der Fragestellung, inwiefern der Nachweis der *SRSF2*-Mutation dabei hilfreich sein kann, die Diagnose CMML von gängigen Differentialdiagnosen abzugrenzen[1]. Deshalb wurde die *SRSF2*-Mutation sowohl bei Patienten mit CMML, als auch bei Patienten mit verschiedenen MDS und MPN untersucht[1]. Zusätzlich sollte mit der RFLP-Analyse eine einfache

und schnelle Screening-Methode etabliert werden, die routinemäßig in der Diagnostik einsetzbar ist[1].

Weiterhin sollte bei allen Patienten auch der *JAK2*-Mutationsstatus untersucht werden[1]. Zusammen mit dem *SRSF2*-Mutationsstatus sollten damit insbesondere Grenzfälle zwischen der CMML und MPNs wie der PMF genau betrachtet werden, und mögliche Einflüsse der einzelnen Mutationen auf die klinische und histopathologische Präsentation der Erkrankungen untersucht werden[1].

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
8-Kanal-Pipette	Gilson, Middleton, WI, USA
Agencourt Magnetplatte	Beckman Coulter, Krefeld
Biofuge 13R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Geldokumentation CN-300-WL/LC	Peqlab, Erlangen
Gelkammer, Schlitten, Kämmen	Peqlab, Erlangen
GeneTouch Thermal Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf
GenomeLab GeXP -Sequencer	Beckman Coulter, Krefeld
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
LightCycler 480II	Roche, Penzberg
Microwave 800	Severin, Sundern
Mikroskope	Zeiss, Oberkochen
Mini-Zentrifuge	Biozym, Hessisch Oldendorf
Mini-Zentrifuge	neoLab, Heidelberg
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Gene Amp PCR Systems 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomix Thriller	Peqlab, Erlangen
Speedvac	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Vortex-Genie 2

Scientific Industries, Bohemia, NY,  
USA

### 2.1.2 Reagenzien

#### **Reagenz**

Agencourt AMPure XP

Agencourt CleanSEQ

Chloroform

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

ddH<sub>2</sub>O (DNase/RNase frei)

DNA Gel Loading Dye (6x)

dNTP-Mix (jeweils 10mM)

Ethanol

GelRed

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder,  
ready-to-use

GeneRuler 50 bp DNA Ladder

Isoamylalkohol (24:1)

LE Agarose

Lithiumchlorid, 8M

Mineralöl

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol  
(25:24:1); pH 8,0

Sample Loading Solution (SLS)

Xylol

#### **Hersteller, Ort**

Beckman Coulter, Krefeld

Beckman Coulter, Krefeld

VWR, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Thermo Fisher Scientific (Gibco),  
Waltham, MA, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
MA, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
MA, USA

Merck, Darmstadt

Biotium, Hayward, CA, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
MA, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
MA, USA

AppliChem, Darmstadt

Biozym, Hessisch Oldendorf

AppliChem, Darmstadt

Beckman Coulter, Krefeld

Roth, Karlsruhe

Beckman Coulter, Krefeld

VWR, Darmstadt

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
<u>TBE-Puffer</u> (5x)	Tris-Base 445 mM Borsäure 445 mM EDTA 12,5 mM	Sigma Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt AppliChem, Darmstadt
<u>TE-Puffer</u> (DNA- Lysepuffer, pH 8,5)	Tris-Base (50mM, pH 8)  EDTA (1mM)  Tween 20 (0,5%)	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham, MA, USA Sigma Aldrich, Steinheim

### 2.1.4 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
GenomeLab DTCS-Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld

### 2.1.5 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (50U/μl), inklusive PCR-Puffer und MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FastDigest BsaJI (BsaDI), inklusive FastDigest Green Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protease	Qiagen, Hilden

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
96Well-Platte	Beckman Coulter, Krefeld
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg

Multiply- $\mu$ StripPro 8er Kette mit  
anhängendem flachen Deckel 0.2 ml  
natur  
Pipettenspitzen

Sarstedt, Nümbrecht

Biozym, Hessisch Oldendorf

## 2.1.7 Primer

Hersteller: Sigma Aldrich, Steinheim

### PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5`-3`</b>
AF4/X3U	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
AF4/X3L	CATCCATGGGCCGGACATAA
AF4/X11U	CCGCAGCAAGCAACGAACC
AF4/X11L	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC
PLZF/X1U	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
PLZF/X1L	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC
RAG1/X2U	TGTTGACTCGATCCACCCCA
RAG1/X2L	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
TBXAS1/X9U	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
TBXAS1/X9L	GGTGTGCGCCGGGAAGGGTT

### SRSF2-PCR

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
SRSF2_P3l_M13_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTGAGGACGCTAT GGATG
SRSF2_P3k_M13_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGAGCTGCGGGTGCA AAT
SRSF2_P3_M13m_R	CAGGAAACAGCTATGACAATCATCGGCTGTGGT GTGAGTCC

### Cycle-Sequencing-Reaktion

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
M13_F	TGTA AACGACGGCCAGT
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC

### JAK2-PCR

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
JAK2-Ex14-2F	AGCAGCAAGTATGATGAGC
JAK2-Ex14-2B	AGAAAATTCAGTTTCAGGATCACAGCT

### KIT-PCR

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
KIT_816_2F	CAGCCAGAAATATCCTCCTTACT
KIT_816_2B	TTGCAGGACTGTCAAGCACAG

### 2.1.8 Sonden

Hersteller: TIB Molbiol, Berlin

### JAK2-Schmelzpunktanalyse

<b>Sonde</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
Probe (Anchor)	LC Red 640-AAAACCAAATgCTTgTgAgAAAgCT--PH
Probe (Sensor/Mut)	GTCTCCACAGAAACATACTCCATAA--FL
LNA (Clamp)	+C+CA+CAgA+CA+CATA+CT+C+CA+--NH

### KIT-Schmelzpunktanalyse

<b>Sonde</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
ckit Anchor	LC640-ATgTggTTAAAggAAACgTgAgTACCCA—PH
ckit mut	LC-AgC CAg AgT CAT CAA gAA TgA TTC TA—FL
PNA	GCC AGA GAC ATC AAG AAT G

## 2.2 Patientenkollektiv

### 2.2.1 Knochenmarksbiopsien

Die in dieser Studie analysierten Biopsien entstammen dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen[1]. Alle Biopsien waren ursprünglich mit Formalin fixiert, mit EDTA entkalkt und anschließend in Paraffin eingebettet worden (FFPE)[1,57]. Die Studie wurde vom lokalen Ethik-Komitee genehmigt (Antrag 106/2013 B02)[1].

### 2.2.2 Zusammensetzung der Studiengruppe

Für das Untersuchungskollektiv wurden aus dem Archiv Patienten ausgewählt, die laut histologischem Befund die gesicherte oder wahrscheinliche Diagnose einer CMML gestellt bekommen hatten[1]. Sofern vorhanden wurden pro Patient alle archivierten Knochenmarksbiopsien ausgehoben, um auch Aussagen über das Auftreten und den Stellenwert der Mutation im Krankheitsverlauf machen zu können. Die Mutationsanalyse wurde für alle Proben sowohl mit der Sanger-Sequenzierung als auch mit der RFLP-Analyse durchgeführt.

### 2.2.3 Zusammensetzung der Kontrollgruppen

Um die Häufigkeit der *SRSF2*-Mutation bei Patienten mit CMML im Bezug zu anderen myeloischen Neoplasien einordnen zu können und die Spezifität der Untersuchungsmethode zu beurteilen, wurde das Vorliegen der Mutationen auch bei verschiedenen Kontrollgruppen untersucht[1]. Für die Kontrollgruppen wurden Patienten mit gängigen Differentialdiagnosen zur CMML und zum Teil auch noch nicht eindeutig klassifizierte Fälle herausgesucht[1]. Dadurch mussten nach Abschluss der umfassenden histologischen und klinischen Reklassifikation (2.3.1) auch Patienten im Nachhinein einer anderen Gruppe zugeordnet werden[1].

Für die erste Kontrollgruppe wurden Knochenmarksbiopsien von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen (MPN) untersucht, für die zweite Kontrollgruppe von Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS)[1]. Für die dritte

Kontrollgruppe wurde DNA aus normalem, bzw. reaktiv verändertem Knochenmark ohne malignem Befund verwendet[1].

## **2.3 Methoden**

### 2.3.1 Histologische und klinische Klassifikation

Nach Auswahl der Patienten für die CMML-Gruppe und die MDS-, sowie MPN-Kontrollgruppe erfolgte eine Reklassifikation nach der aktuellen WHO-Klassifikation[1,2].

Zum einen wurden hierfür die klinischen Daten zu Blutbild, Knochenmarkszytologie, Zytogenetik, Datum der Erstdiagnose, klinischem Verlauf und klinischen Befunden wie Milzgröße oder B-Symptomatik aus Arztbriefen, bzw. dem Archiv der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen erhoben[1].

Zum anderen wurden von allen Patienten folgende histochemische Färbungen der Knochenmarksbiopsien beurteilt: Hämatoxylin-Eosin-, Giemsa-, Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-) und Chloracetatesterase-Färbung zur Differenzierung der Zellen der Hämatopoese, eine Silberfärbung (Gomori) zur Beurteilung des Fasergehaltes des Knochenmarks sowie die Berliner-Blau-Reaktion zur Beurteilung der Eisenspeicher im Knochenmark[1,57]. Immunhistochemisch wurden die CD14- und die CD34-Färbung von allen Proben beurteilt. Sofern initial nicht vorhanden, wurden die Färbungen aus dem Gewebeblock erneut angefertigt[1]. Wenn erforderlich wurden zusätzlich eine CD61-, CD117- sowie weitere immunhistochemische Färbungen ergänzend begutachtet[1].

Alle histologischen und immunhistochemischen Schnitte wurden von einem erfahrenen Hämatopathologen klassifiziert. Die klinischen Befunde wurden zusammen mit einer Fachärztin für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie beurteilt. In Zusammenschau aller Befunde erfolgte dann die Einteilung der Patienten nach der WHO-Klassifikation[1,2].

### 2.3.2 Isolation und Aufreinigung von DNA aus Paraffingewebe

Für die verschiedenen Techniken zum Nachweis der *SRSF2*-Mutationen aus Formalin-fixiertem Paraffingewebe, ist jeweils zuerst die Isolation und Aufreinigung der DNA aus diesen Geweben notwendig[58].

Hierfür erfolgte als erster Schritt die Entparaffinierung des Gewebes[1]. Von einem Paraffin-Gewebeblock wurden fünf 5 µm dicke Schnitte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 ml 100 %igem Xylol versetzt, gevortext, 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und das Xylol wieder abgenommen und verworfen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und dann im Anschluss dieselbe Prozedur zwei Mal mit 100 %igem Ethanol durchgeführt, um alles Xylol wieder auszuwaschen. Das entstandene Gewebepellet wurde anschließend bei 30°C getrocknet, um den Alkohol vollständig zu entfernen.

Um eine möglichst hohe DNA-Ausbeute aus den teilweise relativ kleinen Knochenmarksstanzen zu erhalten, wurde der enzymatische Gewebeerddau mittels Protease (Qiagen, Hilden) unter kontinuierlichem Schütteln über volle 48 Stunden bei 56°C in 300 µl DNA-Lysepuffer durchgeführt[1].

Um Zellreste, Protein, und RNA zu entfernen und eine möglichst reine DNA zu erhalten, wurde im Anschluss an den Verdau eine Aufreinigung mit Phenol-Chloroform durchgeführt[1]. Dazu wurde im ersten Schritt 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; pH 8; (Roth, Karlsruhe)) zur Probe hinzugefügt, gevortext und 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Dabei entstehen drei Phasen, die untere organische Phase, die Interphase und die obere, wässrige Phase. Bei pH 8 löst sich die DNA dabei in der Regel in der wässrigen Phase. Diese wird abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um das Produkt weiter aufzureinigen, wurde der gesamten wässrigen Überstand ein zweites Mal mit 1 Volumen Phenol-Chloroform versetzt, gevortext und zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Um das restliche Phenol auszuwaschen, wurde 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gevortext, zentrifugiert und der wässrige Überstand mit der gelösten und aufgereinigten DNA ein letztes Mal in ein neues Gefäß überführt. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 0,1 Volumen LiCl (8 M) und 1 ml 100 %iges Ethanol hinzugefügt, eine Stunde

bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanol wurde noch einmal 0,2 ml auf -20°C gekühltes Ethanol hinzugegeben, 5 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das dabei entstandene DNA-Pellet wurde zum vollständigen Entfernen des Ethanol getrocknet. Der Vorteil der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion im Vergleich zu automatisierten Extraktionsverfahren ist, dass im nächsten Schritt die Menge an ddH<sub>2</sub>O zum Lösen der DNA frei gewählt werden kann. Je nach Gewebemenge und Größe des Pellets wurde die DNA in 10-50 µl gelöst. So konnte auch bei kleinen erwarteten DNA-Mengen durch Zugabe einer geringen Menge an ddH<sub>2</sub>O noch eine hohe Konzentration an DNA erzielt werden, wodurch die für die folgenden Analysen erforderliche Konzentration von 50 ng/µl erreicht wurde. Abschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) photometrisch ermittelt und bei Bedarf Verdünnungen auf 50 ng/µl oder 100 ng/µl für die folgenden Analysen hergestellt.

### 2.3.3 PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA

Der gesamte Prozess der Fixation des Knochenmarks mit Formalin, der Entkalkung, der Paraffineinbettung, der DNA-Extraktion und der -Aufreinigung verursacht Schäden und Strangbrüche an der DNA[35]. Dadurch besteht DNA, die aus FFPE-Material extrahiert wurde, meist aus Fragmenten kürzer als 500 bp, unabhängig von der Extraktionsmethode[35]. Um die Bedingungen für eine erfolgreiche Amplifikation in den folgenden PCR-Reaktionen abschätzen zu können, sollte die Amplifizierbarkeit der DNA vorher untersucht werden[58,59].

Dazu wurde die von der BIOMED-2-Gruppe entwickelte Multiplex-Kontroll-PCR angewandt[1]. Diese verwendet 5 verschiedene Primerpaare, die in unterschiedlichen Genen (*TBXAS1*, Exon 9; *RAG1*, Exon 2; *PLZF1*, Exon 1; *AF4*, Exon 3; *AF4*, Exon 11) binden[60]. Alle Zielexons sind so gewählt, dass das Risiko für Polymorphismen, die die Amplifizierbarkeit heruntersetzen

könnten, gering ist[60]. Durch die gewählten Primerpaare werden Produkte mit 100bp, 200bp, 300bp, 400bp und 600bp amplifiziert[60] (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Multiplex-Kontroll-PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA**  
Quelle (inhaltlich): [60]

<b>Multiplex-Kontroll-PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA</b>			
<b>Primer</b>	<b>PCR-Produkt</b>		
AF4/X3U AF4/X3L	600 bp-Fragment		
AF4/X11U AF4/X11L	400 bp-Fragment		
PLZF/X1U PLZF/X1L	300 bp-Fragment		
RAG1/X2U RAG1/X2L	200 bp-Fragment		
TBXAS1/X9U TBXAS1/X9L	100 bp-Fragment		
<b>Reaktionsansatz</b>			
<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration/-menge in PCR</b>	
15,8 µl	ddH <sub>2</sub> O	-	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	1x	
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 mM	
2 µl	Primer-Mix	AF4/X3 jeweils 2,5 pM, andere 1,25 pM	
0,4 µl	dNTPs (10 mM)	160 µM	
0,3 µl	AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,5 U	
2 µl	DNA (50 ng/µl)	100 ng	
<b>PCR-Programm</b>			
<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Beschreibung</b>
95°C	7 min		Denaturierung
95°C	45 s	35 Zyklen	Denaturierung
60°C	45 s		Annealing
72°C	90 s		Elongation
72°C	10 min		Elongation
12°C			Hold

### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht[60]. Dazu wurde ein 2 %iges Agarose-Gel hergestellt, bestehend aus 2 g Agarose gelöst in 100 ml TBE-Puffer. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden wurden 10 µl GelRed-Lösung hinzugegeben. GelRed ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in

die DNA interkaliert und durch UV-Licht angeregt werden kann, wodurch die DNA sichtbar gemacht werden kann. Zur Elektrophorese wurden 15 µl des PCR-Produkts 1:6 mit Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen überführt. Zusätzlich wurde in eine weitere Tasche ein geeigneter Größenmarker gegeben, im Falle der Amplifizierbarkeitstest-PCR ein 100 bp-Marker. Je nach Gellänge wurde für 20-45 Minuten eine Spannung von 140 Volt angelegt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel im Anschluss unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

### 2.3.5 *SRSF2*-PCR

Zur Mutationsanalyse des *SRSF2* Kodons 95 wurde zunächst ein 145 bp langes Fragment aus dem entsprechenden Genabschnitt mittels konventioneller PCR amplifiziert[1] (Tabelle 2). Dieses Fragment enthält das beschriebene Hotspot-Kodon 95, in dem die meisten bisher beschriebenen Mutationen gefunden wurden[1] (1.4.2). Für die Sanger-Sequenzierung wurden dem Forward- (SRSF2\_P3l\_M13\_F) und dem Reverse-Primer (SRSF2\_P3\_M13m\_R) für standardisierte Sequenzierungsbedingungen jeweils die gängigen M13-Sequenzierprimer-Anhänge angefügt[1]. Da das Kodon 95 nahe am 3'-Ende des Genabschnitts liegt, wurde im Reverse-Primer zwischen M13-Primerabschnitt und sequenzspezifischem Abschnitt zusätzlich eine 6 Basenpaar-Verlängerung eingefügt. Nach Amplifikation wurde das Ergebnis der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Für Fälle mit stark fragmentierter DNA, bei denen sich das 145 bp lange Fragment nicht amplifizieren ließ, wurde ein anderer Forward-Primer (SRSF2\_P3k\_M13\_F) designt, mit dessen Verwendung ein kürzeres Produkt von 97 bp um das Kodon 95 amplifiziert werden sollte[1] (Tabelle 2).

Tabelle 2: *SRSF2*-PCR  
Quelle (inhaltlich): [1]

<b>SRSF2-PCR</b>			
<b>Primer</b>		<b>Amplifiziertes Fragment</b>	
SRSF2_P3l_M13_F SRSF2_P3_M13m_R		145 bp-Fragment aus <i>SRSF2</i> , Exon 1	
SRSF2_P3k_M13_F SRSF2_P3_M13m_R		97 bp-Fragment aus <i>SRSF2</i> , Exon 1	
<b>Reaktionsansatz</b>			
<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration/ -menge in PCR</b>	
16,75 µl	ddH <sub>2</sub> O		
2,5 µl	10fach PCR-Puffer	1 fach	
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 mM	
0,75 µl	Forward-Primer (10 µM)	0,3 µM	
0,75 µl	Reverse-Primer (10 µM)	0,3 µM	
0,5 µl	dNTPs (10 mM)	200 µM	
0,25 µl	AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,25 U	
2 µl	DNA (50 ng/µl)	100 ng	
<b>PCR-Programm</b>			
<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Beschreibung</b>
95°C	5 min		Denaturierung
95°C	30 s	34 Zyklen	Denaturierung
59°C	75 s		Annealing
72°C	45 s		Elongation
72°C	10 min		Elongation
12°C			Hold

### 2.3.6 *SRSF2*-Mutationsanalyse mittels Sanger Sequenzierung

Zur primären Charakterisierung des *SRSF2* Kodon 95 Mutationsstatus wurde die bidirektionale Sanger-Sequenzierung angewandt. Sie wurde bei allen Proben der Studiengruppe durchgeführt. Als Vorbereitung auf die Kettenabbruch-PCR nach Sanger wurden die Produkte aus der *SRSF2*-PCR zunächst mit Hilfe des Agencourt AMPure XP - Kits (Beckman Coulter, Krefeld) aufgereinigt[1]. Dieser Schritt ist notwendig, um die Primer, die Elektrolyte, die Nukleotide und die Polymerase aus der vorangegangenen PCR zu entfernen, da diese, insbesondere die Primer, die folgende Kettenabbruch-PCR stören würden. Es wurde analog zu den Herstellerinformationen verfahren. Die Aufreinigung basiert auf der SPRI®-Technologie mit magnetischen Beads.

1,8 Volumen AMPure wurden je nach Bandenstärke zu 10-15 µl PCR-Produkt gegeben. Die Beads binden die PCR-Produkte, nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden diese mit Hilfe einer Magnetplatte am Boden oder an der Wand der Reaktionsgefäße gehalten und die Flüssigkeit abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurden die DNA-tragenden Beads noch zwei Mal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um sicher alle Stoffe außer der gebundenen DNA zu entfernen. Dazu wurden jeweils 200 µl 70 %iges Ethanol hinzugegeben, 3 Minuten inkubiert und die Flüssigkeit wieder abgenommen und verworfen. Die Beads wurden noch kurz an der Luft getrocknet, um sicher alles Restethanol zu entfernen. Durch Zugabe von 30-40 µl ddH<sub>2</sub>O und resuspendieren der Lösung wurden die PCR-Produkte wieder von den Beads getrennt.

Für die anschließende Kettenabbruchreaktion (Cycle Sequencing Reaktion) wurde das GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet[1]. Der DTCS-Mix enthält die notwendigen Reagenzien für die Kettenabbruch-PCR wie die dNTPs, die fluoreszenzmarkierten ddNTPs, die Polymerase und Pufferlösung. Je nach ursprünglicher Bandenstärke wurden 4-7 µl des aufgereinigten PCR-Produkts zusammen mit 2 µl DTCS-Mix in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben[1]. Als Primer wurde der Standard-M13-Sequenzierprimer verwendet[1], entweder Forward oder Reverse, um später in beiden Richtungen die Sequenz ermitteln zu können. Mit ddH<sub>2</sub>O wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt[1] (Tabelle 3).

Tabelle 3: Cycle-Sequencing-Reaktion  
 Quelle (inhaltlich): [1]

<b>Cycle Sequencing Reaktion mit dem GenomeLab DCTS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld)</b>			
<b>Reaktionsansatz</b>			
<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>		
4-7 µl	Aufgereinigtes PCR-Produkt, je nach Bandenstärke nach der Gelelektrophorese		
2 µl	DTCS-Mix		
1 µl	M13-Primer Forward oder Reverse (10 pmol/µl; Endkonzentration in PCR 1 pmol/µl)		
0-3 µl	ddH <sub>2</sub> O zum Auffüllen auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl		
<b>PCR-Programm</b>			
<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Beschreibung</b>
96°C	20 s	34 Zyklen	Denaturierung
50°C	20 s		Annealing
60°C	4 min		Elongation

Bevor die Sequenz analysiert werden konnte, musste eine weitere Aufreinigung durchgeführt werden, um überschüssige dNTPs, fluoreszierende ddNTPs und Salze zu entfernen. Hierzu wurde CleanSeq (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet[1]. Analog zum oben beschriebenen AMPure, basiert dieses Verfahren ebenso auf der Verwendung magnetischer Beads, die die Produkte der Kettenabbruch-PCR binden. Die Prozedur erfolgte entsprechend den Herstellerinformationen. Zu den 10 µl aus der Sequenzier-PCR wurden 10 µl CleanSeq und 42 µl 85 %iges Ethanol gegeben und gemischt. Mit Hilfe einer Magnetplatte wurden die Beads mit den gebundenen Produkten der Cycle Sequencing Reaktion am Rand der Reaktionsgefäße fixiert und die Flüssigkeit nach 3 Minuten Inkubationszeit abgenommen und verworfen. Darauf folgte ein Waschschrift mit 100 µl 85 %igem Ethanol, welches hinzugegeben und nach 30 Sekunden Inkubationszeit in der Magnetplatte wieder vollständig entfernt und verworfen wurde. Nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Beads in 40 µl Sample Loading Solution (Beckman Coulter, Krefeld) resuspendiert, was die Elution der Kettenabbruchprodukte zur Folge hatte.

Zur Sequenzanalyse mit dem GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld)[1] wurden die aufgereinigten Proben in eine 96-Well-Platte überführt und mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt, um Verdunstung zu verhindern. Die einzelnen Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese der Länge nach basengenau aufgetrennt und anhand der Fluoreszenzabfolge wurde schließlich die Sequenz ermittelt. Die erfolgte mit der GenomeLab-GeXP Software 10.2 (Beckman Coulter, Krefeld)[1]. Von allen Proben wurde die Sequenz sowohl in Forward- als auch in Reverse-Richtung ermittelt, um doppelte Sicherheit bei der Klärung der Frage nach Mutationen zu erreichen.

### 2.3.7 RFLP-Analyse zur Detektion von *SRSF2*-Mutationen

Für die RFLP-Analyse (1.4.5) wurden 10 µl des PCR-Produkts aus der *SRSF2*-PCR mit 0,5 µl BsaJI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 µl FastDigest Green Buffer (10 fach) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 17,5 µl ddH<sub>2</sub>O vermischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert[1]. Im Anschluss wurden die entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese bei 120 V in einem 3 %igen Agarose-Gel aufgetrennt[1] und die entstandenen Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Bei allen Proben der Studiengruppe wurden die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung mit denen der RFLP-Analyse verglichen. In den Kontrollgruppen wurde die Mutationsanalyse zuerst mit der RFLP-Analyse durchgeführt. Alle Proben mit einem für die Mutation charakteristischem Bandenmuster sowie weitere Wildtyp-Stichproben wurden anschließend sequenziert.

### 2.3.8 Mutationsanalyse der *JAK2*- und *KIT*-Hotspots

Die *JAK2*-V617F-Mutationsanalyse wurde bei allen Proben durchgeführt, die Analyse auf die *KIT*-D816V-Mutation zusätzlich bei Proben mit assoziierter systemischer Mastozytose[1]. Die Analysen wurden von Dr. David Rosero analog wie bereits beschrieben durchgeführt[1,61]. Das Prinzip der Methoden soll am Beispiel der *JAK2*-Mutationsanalyse kurz erläutert werden.

Ein 162 bp langes Fragment, das das Kodon 617 im Exon 12 des *JAK2*-Gens enthält, wurde mittels PCR amplifiziert[1].

Zur Detektion der Mutation wurde direkt im Anschluss eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt[1]. Hierfür werden zum PCR-Produkt so genannte FRET(fluorescence resonance energy transfer)-Sonden hinzugegeben. Dies sind zwei Oligonukleotide (Donor- und Acceptor-Sonde), die beide in unmittelbarer Nähe zueinander komplementär an die Ziel-DNA binden. In der beschriebenen Analyse bindet die Donor-Sonde im Bereich des Kodons 617, und zwar spezifisch am mutierten Allel, und die Akzeptor-Sonde in unmittelbarer Nähe dazu. An beide Sonden sind unterschiedliche Fluorophore gekoppelt. Durch Licht einer bestimmten Wellenlänge kann die Donor-Sonde angeregt werden. Sind beide Sonden nah aneinander an die Ziel-DNA gebunden, wird die Akzeptor-Sonde ihrerseits durch das Licht der Donor-Sonde angeregt. Das dadurch emittierte Lichtsignal kann dann im LightCycler (Roche, Penzberg) quantitativ gemessen werden. Für die Schmelzpunktanalyse wird die DNA erst kurz durch Erhitzen denaturiert und dann wieder abgekühlt um die Hybridisierung der FRET-Sonden zu ermöglichen. Nun wird langsam erhitzt und dabei in kurzen Abständen die Fluoreszenz gemessen. An einem bestimmten Schmelzpunkt dissoziieren die Sonden von der DNA und das Fluoreszenz-Signal nimmt somit ab. Die Schmelztemperatur kann anhand der ersten negativen Ableitung der Zeit/Fluoreszenz-Kurve durch das Maximum abgelesen werden. Da die Donor-Sonde komplementär zum mutierten Kodon 617 bindet, entsteht im Falle vorhandener mutierter DNA ein Maximum mit höherer Schmelztemperatur[57,61-64].

Eine PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse wurde für jede Probe jeweils mit und ohne die Zugabe eines LNA(locked nucleic acid)-Oligomers durchgeführt[1]. Dieses Oligomer bindet spezifisch an DNA-Stränge, die im Kodon 617 die Wildtyp-Sequenz aufweisen. Durch ein verändertes Ribosegerüst dissoziiert das LNA-Oligomer erst bei einer Schmelztemperatur, die über der Elongationstemperatur liegt, von der DNA und verhindert dadurch die Amplifikation. Dies sorgt dafür, dass mutierte DNA, sofern vorhanden, bevorzugt amplifiziert wird. Dadurch kann die Mutation, insbesondere im Falle einer niedrigen Last an Tumorzellen, mit höherer Sensitivität detektiert werden[57,61,65].

### 2.3.9 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism4.03 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt[1]. P-Werte sind zweiseitig und wurden wenn kleiner als 0,05 als signifikant betrachtet[1]. Zur Berechnung der Überlebensraten wurde die Kaplan-Meier-Methode angewendet[1]. Zum Vergleich der Überlebensraten wurde der Logrank-Test verwendet[1]. Für das Follow-up wurden nur Patienten berücksichtigt, die zum Berechnungszeitpunkt noch am Leben waren[1].

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Histologische und klinische Klassifikation

#### 3.1.1 Zusammensetzung und Beschreibung der Studiengruppe

Nach Auswertung aller Daten zu Klinik und Blutbild sowie histologischer Klassifikation der Knochenmarksbiopsien, wurden 36 Patienten in die CMML-Gruppe eingeschlossen[1]. Alle 36 erfüllten die Diagnosekriterien der WHO-Klassifikation für die Diagnose CMML[1]. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen die Diagnose aufgrund fehlender klinischer Daten oder nicht ausreichend beurteilbarem Knochenmarkstrepanat nicht eindeutig gestellt werden konnte[1]. Zwei dieser 36 Patienten hatten ursprünglich die Diagnose eines MDS gestellt bekommen, wurden dann aber zur Diagnose CMML reklassifiziert. Bei insgesamt fünf dieser Patienten wurden zusätzlich Follow-up-Biopsien analysiert[1].

Die Kohorte beinhaltete 29 Männer und 7 Frauen[1] (Tabelle 4). Das mediane Alter der Patienten lag bei 70 Jahren (49-89 Jahre)[1] (Tabelle 4).

Zweiunddreißig der 36 Patienten erfüllten nach der WHO-Klassifikation die Diagnose CMML-1, bei vier Patienten wurde die Diagnose CMML-2 gestellt[1] (Tabelle 4). Angelehnt an die FAB-Klassifikation (vgl. 1.2.3), konnten zwölf Patienten einer prädominierend dysplastischen Form und 23 Patienten einer prädominierend myeloproliferativen Form der CMML zugeordnet werden (n = 35). Bei sieben Patienten entwickelte sich im Krankheitsverlauf eine AML[1] (Tabelle 4).

Die mediane Leukozytenzahl im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Biopsien lag bei  $15,6 \times 10^9$  pro Liter und reichte von  $3,9 \times 10^9$  bis  $168 \times 10^9$  pro Liter[1] (Tabelle 4). Die absolute Monozytenzahl zu diesem Zeitpunkt lag im Median bei  $3249 \times 10^9$  pro Liter ( $0-27600 \times 10^9$  pro Liter)[1] (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Zusammensetzung der CMML-Studiengruppe  
modifiziert aus [1]**

**Abkürzungen: CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie;  
n: Anzahl**

		<b>Gesamt n= 36</b>
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	7/36
	Männlich	29/36
<b>Alter</b>	Jahre, Median (Spannweite)	70(49-89)
<b>Diagnose</b>	CMML-1	32 (89%)
	CMML-2	4 (11%)
<b>Sekundäre AML</b>		7 (19%)
<b>Monozyten</b>	in %, Median (Spannweite)	29 (2,5-58)
	Zellen/ $\mu$ l, Median (Spannweite)	3249 (0-27600)
<b>Blutbild</b>	Leukozyten x $10^9/l$ Median (Spannweite)	15,6 (3,9-168)
	Hämoglobin in g/dl Median (Spannweite)	12,3 (7,0-16,6)
	Thrombozyten x $10^9/l$ Median (Spannweite)	79 (11-891)

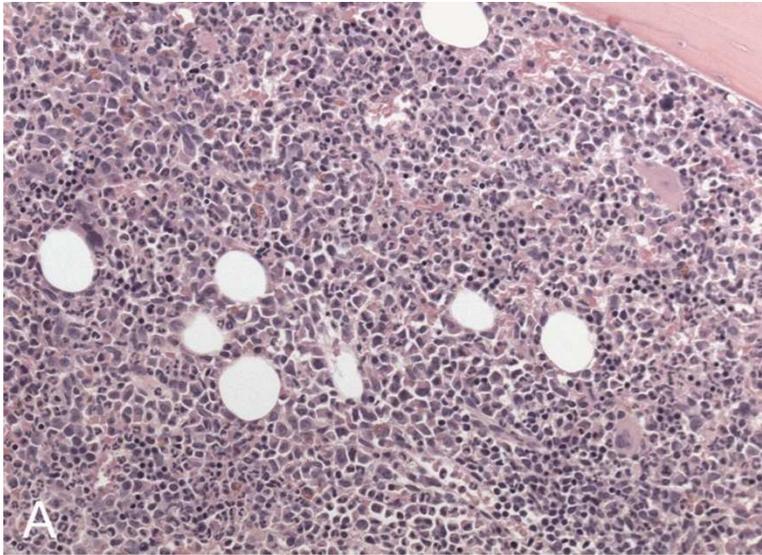
Zytogenetische Daten waren von 23 Patienten verfügbar und zeigten bei 16 Patienten einen normalen Karyotyp[1]. Sieben Patienten zeigten zytogenetische Aberrationen[1] (Tabelle 5), darunter fünf Patienten einen Verlust des Y-Chromosoms.

**Tabelle 5: Zytogenetik der CMML-Patienten  
modifiziert aus [1]**

**Abkürzungen: n: Anzahl**

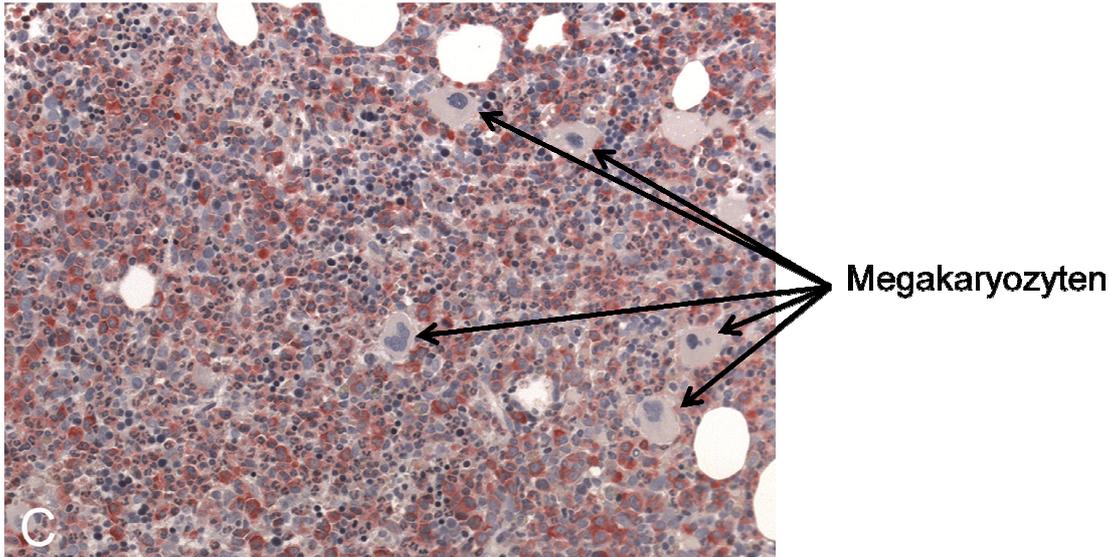
		<b>Gesamt n= 23</b>
<b>Zytogenetik</b>	Normaler Karyotyp	16/23 (70%)
	Aberranter Karyotyp	7/23 (30%)

Die Histologie der Knochenmarksstanzen zeigte größtenteils ein einheitliches Bild[1]. Auffällig war die deutliche Hyperzellularität[1], 30 der 43 Biopsien zeigten eine Zellularität von  $\geq 70\%$  (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten**  
Die Abbildung zeigt ein hyperzelluläres Knochenmark mit vorherrschender Granulopoese.  
Hämatoxylin-Eosin, 200x (Quelle [1])

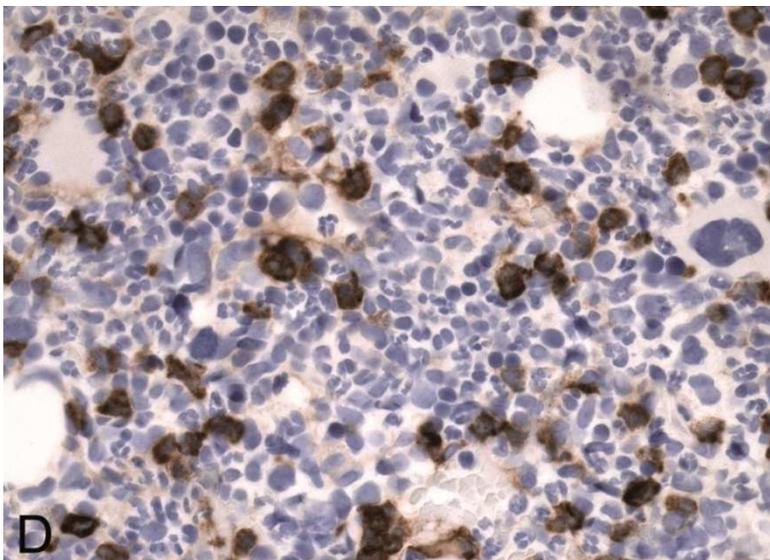
Dysplasiezeichen traten variabel sowohl in der granulopoetischen als auch der erythropoetischen Zellreihe auf[1]. Häufig waren auch Veränderungen der Megakaryozyten. Bei 22 der 36 Patienten zeigten sich eher kleine, dysplastische Mikromegakaryozyten mit hypolobulierten Kernen[1] (Abbildung 12). Abnorm große, der myeloproliferativen Form zuzuordnende Megakaryozyten zeigten sich bei zwei Patienten[1].



**Abbildung 12: Chloracetatesterase-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten mit *SRSF2*-Mutation**

Auf diesem Schnitt sind vermehrt kleine und dysplastische Megakaryozyten mit hypolobulierten Kernen sichtbar. Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase, 200x (modifiziert aus [1])

Immunhistochemisch zeigten sich die CD14 positiven Zellen in allen Fällen deutlich vermehrt[1] (Abbildung 13).



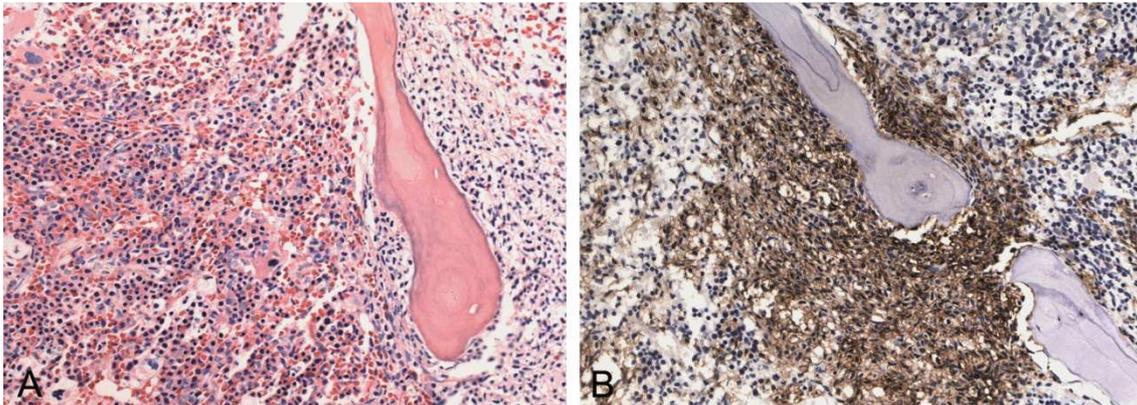
**Abbildung 13: CD14-Färbung des Knochenmarks eines CMML-Patienten mit *SRSF2*-Mutation**

Die CD14 positiven Monozyten und monozytären Vorläuferzellen sind deutlich vermehrt. Immunoperoxidase, 400x (Quelle [1])

Drei der 36 Patienten (8,3%) zeigten zusätzlich Mastzellinfiltrate in den Knochenmarksbiopsien, wodurch bei diesen Patienten in Zusammenschau der

Befunde die Diagnose Systemische Mastozytose mit assoziierter klonaler hämatologischer Nicht-Mastzell-Erkrankung gestellt wurde (SM-AHNMD)[1].

Die Mastzellinfiltrate waren durch die typischen Spindelzellmorphologie sowie einen hohen Fibrosegrad gekennzeichnet[1,66]. Immunhistochemisch waren die Infiltrate durch die Expression von CD117 gut abgrenzbar[1] (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Knochenmarkshistologie eines CMML-Patienten mit Mastzellinfiltraten**

Es handelte sich um einen Patienten mit Mutationen in *SRSF2*, *KIT* und *JAK2*.

**A:** Das hyperzelluläre Knochenmark zeigt Infiltrate spindelförmiger Zellen in der Umgebung der Knochen trabekel (Hämatoxylin-Eosin, 200x) (Quelle [1])

**B:** Immunhistochemie zeigt die Expression von CD117 im Infiltrat (Immunoperoxidase, 200x) (Quelle [1])

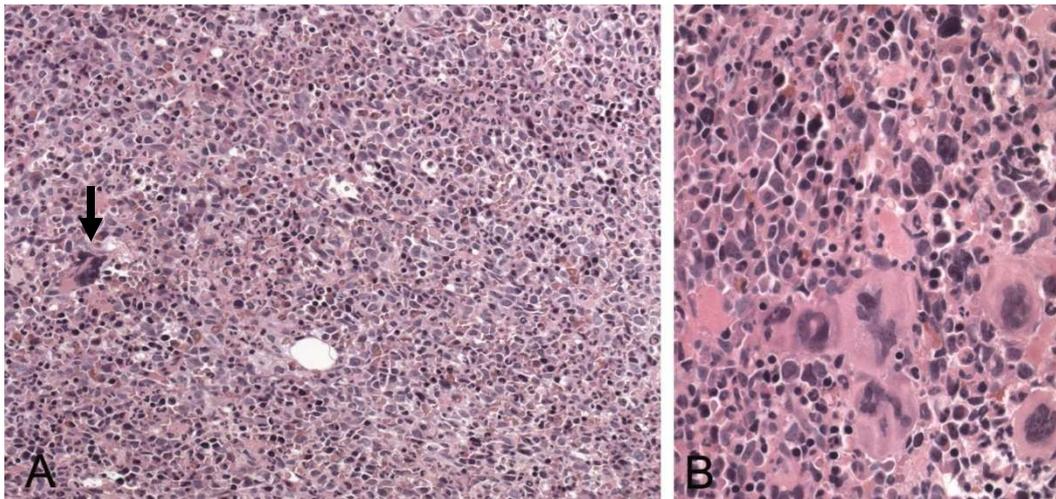
### 3.1.2 Zusammensetzung der MPN-Kontrollgruppe

Nach Abschluss der Klassifikation konnten 20 Patienten zur MPN-Kontrollgruppe zugeordnet werden[1]. Darunter waren zehn Patienten mit einer PMF, zwei Patienten mit einer PV und jeweils ein Patient mit einer ET und einer CML. Die übrigen Patienten wurden aufgrund fehlender Daten nicht präziser klassifiziert.

Zwei dieser 20 Patienten hatten durch erhöhte Monozytenzahlen im peripheren Blut ( $2313$  und  $4558 \times 10^6$  pro Liter) auch die Diagnosekriterien für eine CMML erfüllt und waren ursprünglich als CMML klassifiziert worden[1]. Bei beiden Fällen zeigten sich histologisch eine deutliche Hyperzellularität der Hämatopoese mit vorherrschender Granulopoese sowie eine milde Fibrose (Grad 1)[1]. Die CD14 positiven Zellen waren deutlich vermehrt[1]. Die Megakaryozyten waren atypisch vergrößert und die Kerne hypersegmentiert[1]

(Abbildung 15). Aufgrund der Knochenmarksmorphologie, insbesondere der eher myeloproliferativ wirkenden Megakaryozyten, wurden diese Fälle zu präfibrotischen PMF mit Monozytose reklassifiziert[1].

Ebenso wurde ein Patient, der ursprünglich der MDS-Gruppe zugeordnet war, zu einer PMF umklassifiziert.



**Abbildung 15: Knochenmarkshistologie eines Patienten mit einer präfibrotischen PMF mit Monozytose**

**A:** Das Knochenmark stellt sich deutlich hyperzellulär dar, die Granulopoese ist die vorherrschende Zellreihe. Der Pfeil markiert einen vergrößerten Megakaryozyten mit hyperlobuliertem Kern. (Hämatoxylin-Eosin, 200x) (modifiziert aus [1])

**B:** Ansammlung von vergrößerten, atypischen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Kernen (Hämatoxylin-Eosin, 400x) (Quelle [1])

Zusätzlich zu diesen 20 Patienten wurden noch fünf weitere Fälle aus einer vorherigen Studie ebenfalls auf die *SRSF2*-Mutation untersucht. Es handelte sich um Patienten mit einer PMF, die im Krankheitsverlauf eine Monozytose entwickelt hatten[1,32].

### 3.1.3 Zusammensetzung der MDS-Kontrollgruppe

In die MDS-Kontrollgruppe wurden nach Abschluss der Klassifikation 22 Patienten eingeschlossen[1]. Darin enthalten waren zehn Patienten mit einer RCMD, drei mit einer RA, drei mit einer Refraktären Anämie mit Exzess an Blasten 1 (RAEB1), fünf mit einer RAEB2 und ein Patient mit einer Refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS).

Drei dieser 22 Patienten waren ursprünglich als CMML diagnostiziert worden. Nach Abschluss der klinischen und histologischen Klassifikation zeigte sich

allerdings, dass die Kriterien für eine CMML nicht erfüllt waren und die Fälle wurden als MDS (zwei RCMD, eine RAEB2) klassifiziert.

## 3.2 SRSF2-Mutationsanalyse

### 3.2.1 Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA

Die PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA wurde bei insgesamt 95 verschiedenen DNA-Proben durchgeführt. Durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese konnten die maximal amplifizierbaren Fragmentlängen sichtbar gemacht werden (exemplarische Ergebnisse Abbildung 16).

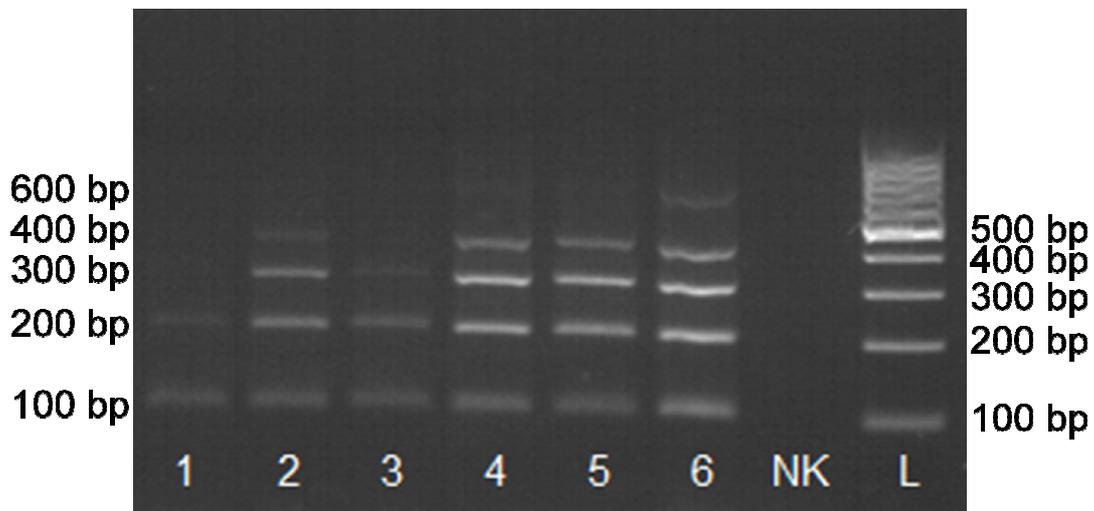
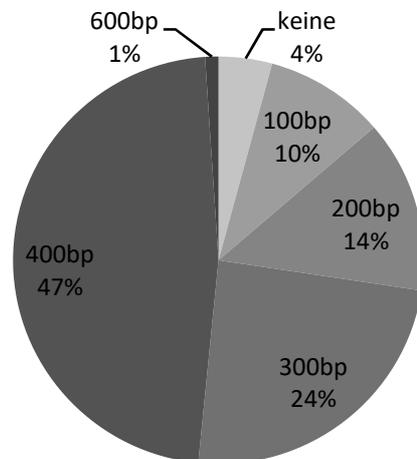


Abbildung 16: Gelelektrophorese nach PCR zur Einschätzung der Amplifizierbarkeit der DNA  
Versuchsaufbau: 2%iges Agarosegel, versetzt mit 10 µl GelRed-Lösung; in Tasche 1-6 und NK  
15 µl PCR-Produkt (jeweils 1:6 versetzt mit Ladepuffer) aus der Multiplex-Kontroll-PCR, in Tasche L  
10 µl 100 bp-Marker; Spannung 140 Volt für 20-45 Minuten; fotografiert unter UV-Licht.  
1-6: verschiedene DNA-Proben; NK: Negativkontrolle, enthielt keine DNA; L: 100 bp-Marker; bp:  
Basenpaare.

Anhand des längsten amplifizierten Produkts kann die Amplifizierbarkeit der untersuchten DNA abgeschätzt werden. Bei Probe 1 zeigte sich nur das 100 bp und das 200 bp-Produkt, bei Probe 3 zusätzlich das 300 bp-Produkt. Bei den Proben 2,4 und 5 ist auch das 400 bp-Produkt amplifiziert worden, bei Probe 6 wurden alle Produkte amplifiziert.

Bei einer Probe zeigte sich eine Amplifizierbarkeit von mindestens 600 bp, 45 Proben zeigten eine Amplifizierbarkeit von maximal 400 bp, 23 Proben eine maximale Amplifizierbarkeit von 300 bp, 13 Proben eine maximale Amplifizierbarkeit von 200 bp. Bei neun Proben wurde nur das Fragment mit einer Länge von 100 bp amplifiziert. Bei vier extrahierten DNA-Proben zeigte

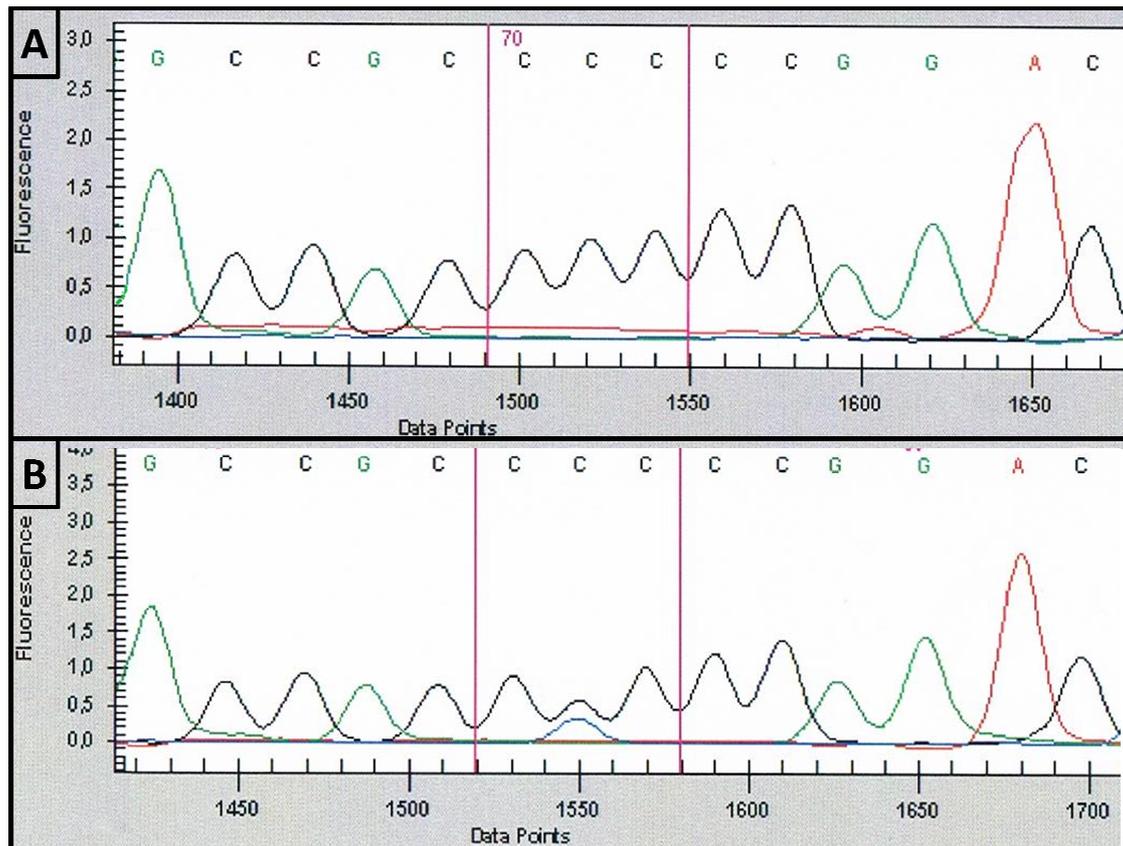
sich nach Gelelektrophorese keine amplifizierte DNA, diese Proben wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der maximalen Amplifizierbarkeit der untersuchten DNA-Proben**  
Gesamtzahl: 93 Proben; bp: Basenpaare

### 3.2.2 Ergebnisse der Studiengruppe

Die bidirektionale Sanger-Sequenzierung zeigte bei 16 der 36 Patienten (44%) eine Mutation im Kodon 95 in Exon 1 des *SRSF2*-Gens[1] (Tabelle 6). Alle identifizierten Mutationen waren Punktmutationen, die zur einem Austausch der Aminosäure Prolin 95 führen[1] (exemplarische Ergebnisse Abbildung 18). Bei fünf der 36 Patienten wurden zusätzlich mehrere Verlaufsbiospien auf die *SRSF2*-Mutation analysiert, zwei trugen die Mutation, drei das Wildtyp-Allel. Bei keinem dieser Patienten änderte sich der *SRSF2*-Mutationsstatus im beobachteten Krankheitszeitraum[1].

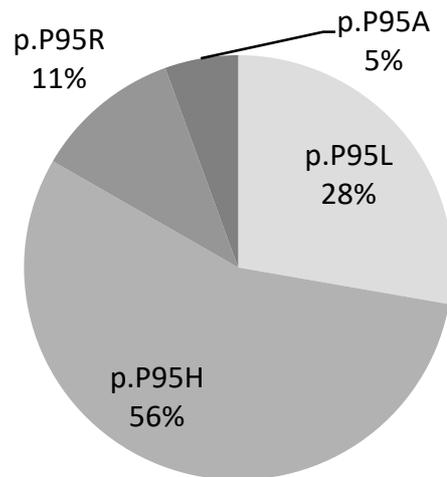


**Abbildung 18:** Elektropherogramm des Kodon 95 (rote Markierung) nach Kapillarelektrophorese im GenomeLab GeXP Sequenzer im Falle der SRSF2-Wildtyp-Sequenz im Kodon 95 (CCC) (A) und im Falle der p.P95L-Mutation (B).

Die mittlere Base (Cytosin) des Kodon 95 zeigt in B eine Überlagerung mit der Base Thymin. Diese Substitution führt auf Aminosäureebene zum Austausch von Prolin durch Leucin.

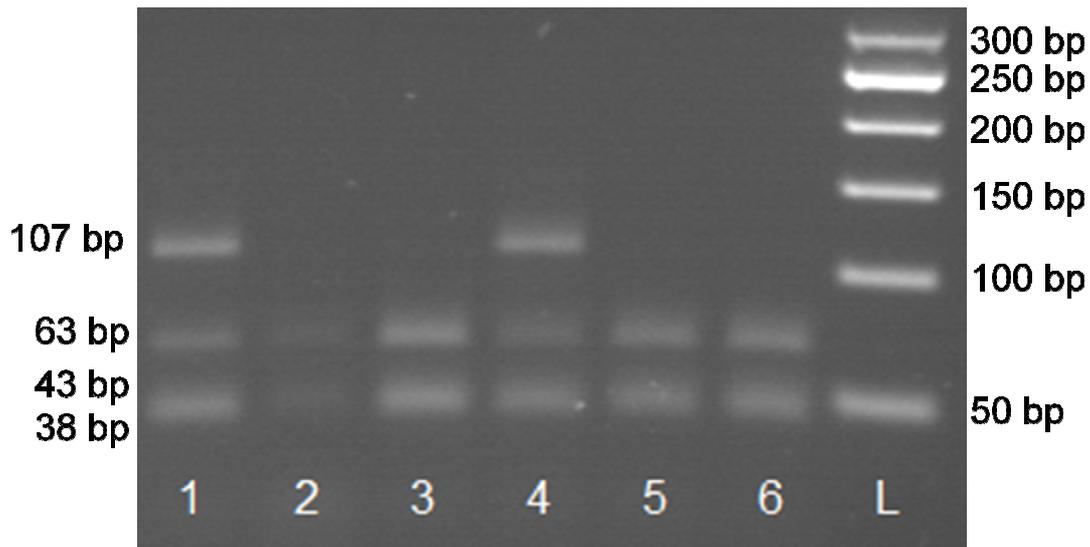
X-Achse: Datenpunkte, Y-Achse: Fluoreszenz

Im Detail zeigte sich bei zehn Patienten die Mutation p.P95H, bei 5 Patienten die Mutation p.P95L, bei 2 Patienten die Mutation p.P95R und bei einem Patienten die Mutation p.P95A[1] (Tabelle 6, Abbildung 19). Keine der in der Literatur beschriebenen Deletionen, Insertionen oder Duplikationen wurden identifiziert.



**Abbildung 19: Verteilung der Mutationen im *SRSF2*-Kodon 95 in der Studiengruppe**  
**Quelle (inhaltlich): [1]**

Bei der RFLP-Analyse zeigte sich das 107 bp-Fragment bei 15 der 16 Patienten mit *SRSF2*-Mutationen[1] (exemplarische Ergebnisse Abbildung 20). Bei allen Patienten mit Wildtyp-Sequenz im Kodon 95 sowie dem einzelnen Fall mit p.P95A-Mutation wurde das 107 bp-Fragment in die beiden kürzeren Fragmente zerschnitten[1]. Die p.P95A-Mutation resultiert aus einer Punktmutation der ersten Cytosinbase des Kodons 95 zu Adenin. Dadurch bleibt die zweite Restriktionsstelle von BsaJI erhalten und es entsteht kein 107 bp-Fragment.



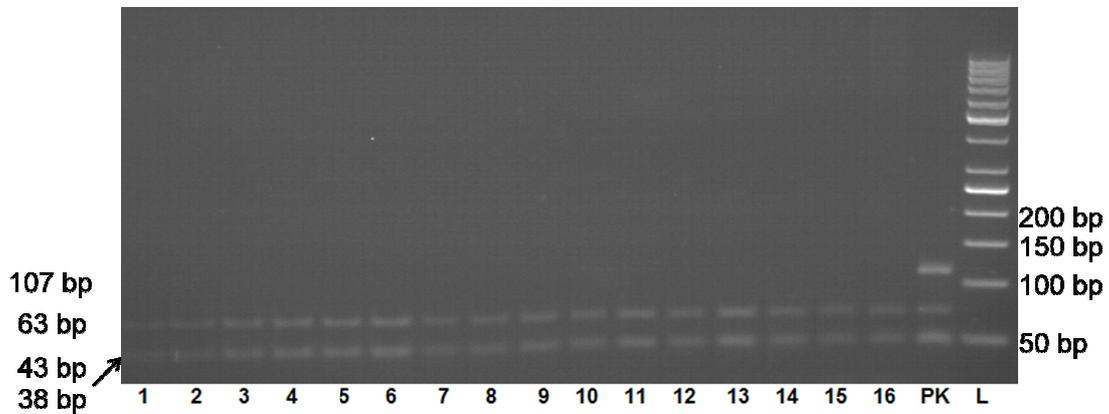
**Abbildung 20: Gelelektrophorese nach BsaJI-Verdau**  
 Versuchsaufbau: 3%iges Agarosegel, versetzt mit 10 µl GelRed-Lösung; in Tasche 1-6 jeweils 15 µl des zuvor mit BsaJI inkubierten PCR-Produkt aus der *SRSF2*-PCR, in Tasche L 10 µl 50 bp-Marker; Spannung 140 Volt für 45-60 Minuten; fotografiert unter UV-Licht.  
 1-6: verschiedene DNA-Proben; L: 50 bp-Marker; bp: Basenpaare  
 Bei den Proben 1 und 4 ist zusätzlich zu den 38 bp-, 44- bp- und 63 bp-Fragmenten das 107 bp-Fragment zu sehen. Dieses Fragment bleibt durch den Verlust der zweiten Restriktionsstelle durch die Mutationen p.P95H, p.P95L und p.P95R erhalten (siehe 1.4.5).

### 3.2.3 Ergebnisse der Kontrollgruppen

In der MPN-Kontrollgruppe zeigte sich durch die RFLP-Analyse bei vier der 20 Patienten (20%) eine Mutation im *SRSF2*-Gen[1]. Mit Hilfe der anschließenden Sanger-Sequenzierung konnten drei der Mutationen als p.P95H und eine als p.P95L charakterisiert werden[1] (Tabelle 6). Bei allen vier Patienten handelte es sich um Patienten mit einer PMF, darin eingeschlossen auch die zwei Patienten, die wegen Monozytose ursprünglich als CMML klassifiziert worden waren[1] (vgl. 3.1.2). Zusätzlich wurden fünf weitere Patienten aus einer vorangegangenen Studie untersucht, die im Krankheitsverlauf einer PMF eine Monozytose entwickelt hatten[1,32]. In zwei Fällen (40%) zeigte sich eine *SRSF2*-Mutation (p.P95H und p.P95L)[1].

In der MDS-Kontrollgruppe (exemplarische Ergebnisse Abbildung 21) zeigte sich eine Mutation im Kodon 95 bei einem der 22 Patienten (4,5%)[1] (Tabelle 6). Explizit handelte es sich um eine p.P95L-Mutation bei einem Patienten mit einer RCMD[1].

Bei der Untersuchung von zehn Fällen mit normalen, bzw. reaktiv verändertem Knochenmark zeigten sich keine Mutationen in der RFLP-Analyse[1].



**Abbildung 21: RFLP-Analyse bei 16 MDS-Patienten**  
 Versuchsaufbau: 3%iges Agarosegel, versetzt mit 10 µl GelRed-Lösung; in Tasche 1-16 und PK jeweils 15 µl des zuvor mit BsaJI inkubierten PCR-Produkt aus der *SRSF2*-PCR, in Tasche L 10 µl 50 bp-Marker; Spannung 140 Volt für 45-60 Minuten; fotografiert unter UV-Licht.  
 1-16: Proben; PK: Positivkontrolle (Probe mit Mutation p.P95L); L: 50 bp-Marker; bp: Basenpaare  
 Bei keinem dieser MDS-Fälle zeigte sich die in der Positivkontrolle erhaltene 107 bp-Bande.

**Tabelle 6: Tabellarische Übersicht über die *SRSF2*-Mutationen in der CMML-Gruppe und den Kontrollgruppen**  
 modifiziert aus [1]  
 Abkürzungen: WT: Wildtyp; MUT: Mutation; CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; MDS: Myelodysplastische Syndrome; MPN: Myeloproliferative Syndrome; n: Anzahl

	CMML n (%)	MDS n (%)	MPN n (%)
<i>SRSF2</i> WT	20 (56%)	21 (95%)	16 (80%)
<i>SRSF2</i> MUT	16 (44%)	1 (5%)	4 (20%)
p.P95H	8 (22%)	0	3 (15%)
p.P95L	5 (14%)	1 (5%)	1 (5%)
p.P95R	2 (6%)	0	0
p.P95A	1 (3%)	0	0
<b>Gesamt</b>	36	22	20

### 3.3 Statistische Auswertung der *SRSF2*-Mutationsanalyse

#### 3.3.1 Diagnostische Aussagekraft der *SRSF2*-Mutationsanalyse

Für die Berechnung der Parameter zur Einschätzung der Aussagekraft von Testverfahren wurde die CMML mit den Differentialdiagnosen MDS und MPN verglichen. Für das Vorliegen einer *SRSF2*-Mutation ergab sich in dieser Studie eine diagnostische Sensitivität von 44,4% und eine Spezifität von 88,1%[1]. Der positive prädiktive Wert betrug 76,2%, der negative prädiktive Wert 64,9%[1] (Tabelle 7). Daraus errechnet ergab sich ein positiver Likelihoodquotient von 3,73 sowie ein negativer Likelihoodquotient von 0,63[1].

**Tabelle 7: Vierfeldertafel zur Berechnung der Parameter zur Abschätzung der Aussagekraft von Testverfahren**

Quelle (inhaltlich): [1]

Abkürzungen: wt: Wildtyp; mut: Mutation; CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; MDS: Myelodysplastische Syndrome; MPN: Myeloproliferative Syndrome, n: Anzahl

	<b>CMML (n=36)</b>	<b>MDS + MPN (n=42)</b>	
<b><i>SRSF2</i> mut (n=21)</b>	<b>16 (44,4%)</b>	<b>5 (11,9%)</b>	Positiver prädiktiver Wert 16/21 = 76,2%
<b><i>SRSF2</i> wt (n= 57)</b>	<b>20 (55,6%)</b>	<b>37 (88,1%)</b>	Negativer prädiktiver Wert 37/57 = 64,9%
	Sensitivität 16/36 = 44,4%	Spezifität 37/42 = 88,1%	

#### 3.3.2 Korrelation mit der Knochenmarksmorphologie

Ohne Kenntnis der Ergebnisse der *SRSF2*-Mutationsanalyse wurden bei jeder Knochenmarksbiopsie folgende Punkte systematisch beurteilt: Zellularität, quantitative Veränderungen in den myeloischen Zellreihen, Vorhandensein von

Dysplasie in den myeloischen Zellreihen, Fibrose, Menge des Speichereisens, Anzahl der CD14 positiven und Anteil der CD34 positiven Zellen[1]. Es zeigten sich keine Assoziationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit diesen Parametern[1].

### 3.3.3 Korrelation mit klinischen Parametern und Zytogenetik

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit den klinischen Parametern Alter, Geschlecht, Blutbild sowie der WHO-Subgruppe (CMML-1 oder CMML-2)[1] (Tabelle 8).

Daten über zytogenetische Veränderungen waren bei 23 Patienten vorhanden. Acht der 16 Patienten (50%) mit normalen Karyotyp zeigten eine Mutation in *SRSF2*, wohingegen nur einer der sieben Patienten (14%) mit abberantem Karyotyp eine Mutation in *SRSF2* aufwies[1]. Somit trat eine *SRSF2*-Mutation signifikant häufiger bei Patienten mit normalem Karyotyp auf ( $p < 0,001$ )[1] (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Tabellarische Übersicht über Patienteneigenschaften, Blutbild und Zytogenetik im Verhältnis zum *SRSF2*-Mutationsstatus in der CMML-Gruppe modifiziert aus [1]**

Abkürzungen: MUT: Mutation; WT: Wildtyp; Hb: Hämoglobin; n.s.: nicht signifikant, n: Anzahl

		Gesamt n= 36	<i>SRSF2</i> MUT n=16	<i>SRSF2</i> WT n=20	P-Wert
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	7/36	3/18	4/18	n.s.
	Männlich	29/36	13/18	16/18	n.s.
<b>Alter</b>	Jahre, Median (Spannweite)	70(49-89)	73 (52-89)	67 (49-82)	n.s.
<b>Diagnose</b>	CMML-1	32 (89%)	14 (89%)	18 (89%)	n.s.
	CMML-2	4 (11%)	2 (11%)	2 (11%)	n.s.
<b>Monozyten</b>	in %, Median (Spannweite)	29 (2,5-58)	29 (4-58)	32 (2,5-56)	n.s.
	Zellen/ $\mu$ l, Median (Spannweite)	3249 (0-27600)	4003 (886-27600)	2968 (0-21431)	n.s.
<b>Blutbild</b>	Leukozyten x $10^9/l$ Median (Spannweite)	15,6 (3.9-168)	21.8 (3.9-168)	14.4 (4-110)	n.s.
	Hb in g/dl Median (Spannweite)	12,3 (7,0-16,6)	11,4 (7,0-16,6)	12,9 (7,0-16,1)	n.s.
	Thrombozyten x $10^9/l$ Median (Spannweite)	79 (11-891)	59.5 (13-485)	93 (11-891)	n.s.
<b>Zytogenetik</b>	Normaler Karyotyp	16/23 (70%)	8/9 (89%)	8/14 (57%)	< 0.001
	Aberranter Karyotyp	7/23 (30%)	1/9 (11%)	6/14 (43%)	

### 3.3.4 Auswirkungen auf AML-Transformation und Überlebensraten

Klinische Verlaufsparemeter waren bei 28 der 36 Patienten mit CMML verfügbar[1]. Bei sieben Patienten wurde eine Transformation in eine AML beobachtet, ohne Assoziation mit dem *SRSF2*-Mutationsstatus[1] (Tabelle 9).

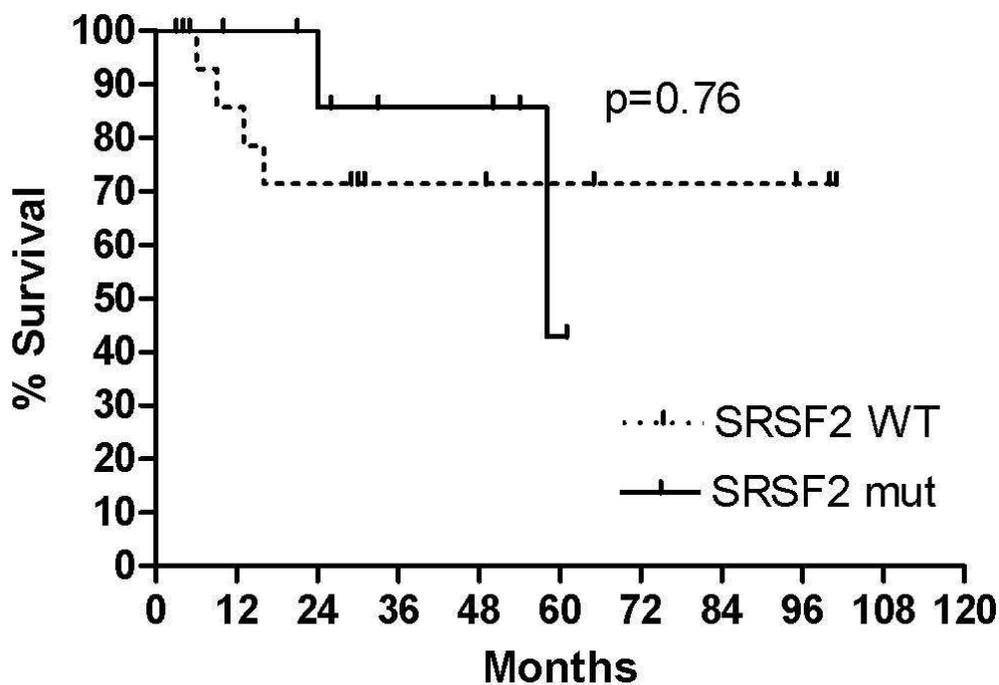
Die aktuelle Überlebensrate bei Patienten mit Mutationen in *SRSF2* lag bei elf von 13 Patienten (85%), der mediane Follow-up-Zeitraum lag bei 757 Tagen (Spannweite 29-1826 Tage)[1] (Tabelle 9). In der Gruppe ohne *SRSF2*-Mutationen lag die Überlebensrate bei zwölf von 15 Patienten (80%), der mediane Follow-up-Zeitraum bei 890 Tagen (Spannweite 21-3024 Tage)[1] (Tabelle 9). Daraus ergab sich in der Kaplan-Meier-Analyse eine 3-Jahres-

Überlebensrate von 86% bei Patienten mit *SRSF2*-Mutationen und 71% bei Patienten mit Wildtyp-*SRSF2*[1] (Tabelle 9, Abbildung 22).

**Tabelle 9: Tabellarische Übersicht über Transformation in AML, Follow-up und Überlebensraten im Verhältnis zum *SRSF2*-Mutationsstatus in der CMML-Gruppe modifiziert aus [1]**

Abkürzungen: MUT: Mutation; WT: Wildtyp; AML: Akute myeloische Leukämie; n: Anzahl

		Gesamt n= 36	<i>SRSF2</i> MUT n=16	<i>SRSF2</i> WT n=20
<b>Sekundäre AML</b>		7	2	5
<b>Follow-Up</b>	Tage Median (Spannweite) (Lebende Patienten)	890 (0-3024)	757 (29-1826)	890 (0-3024)
<b>Kaplan-Meier 3-Jahre-Überlebensrate</b>			86%	71%



**Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensraten in Abhängigkeit vom *SRSF2*-Mutationsstatus (n = 28)**

X-Achse: Überlebensrate in %, Y-Achse: Zeit in Monaten; Quelle [1]

WT: Wildtyp; mut: Mutation

### 3.4 JAK2-Mutationsanalyse

#### 3.4.1 Ergebnisse der JAK2-Mutationsanalyse

Die Schmelzpunktanalyse zur Detektion der *JAK2*-V617F-Mutation zeigte die Mutation bei fünf von 35 Patienten der CMML-Gruppe[1] (Abbildung 23). Bei einem Patienten konnte die *JAK2*-Mutationsanalyse aufgrund schlechter Amplifizierbarkeit der DNA nicht durchgeführt werden. Zusätzlich wurde die Mutation in zwei Verlaufsbiopsien eines Patienten entdeckt, der zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch einen *JAK2*-Wildtyp-Mutationsstatus gezeigt hatte[1]. Somit betrug die Mutationsfrequenz in der CMML-Gruppe insgesamt 17%[1] (Tabelle 10).

Vier der sechs Patienten mit *JAK2*-Mutation hatten gleichzeitig auch eine *SRSF2*-Mutation (67%), wohingegen nur zwölf der 29 Patienten (41%) mit *JAK2*-Wildtyp-DNA eine Mutation in *SRSF2* zeigten[1]. Somit trat die *SRSF2*-Mutation häufiger in der Untergruppe mit *JAK2*-Mutationen auf ( $p = 0,01$ )[1](Tabelle 10).

**Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des *JAK2*-Mutationsstatus in Abhängigkeit des *SRSF2*-Mutationsstatus in der CMML-Gruppe modifiziert aus [1]**

Abkürzungen: WT: Wildtyp; MUT: Mutation, n: Anzahl

	<b>Gesamt n= 36</b>	<b><i>SRSF2</i>MUT n=16</b>	<b><i>SRSF2</i>WT n=20</b>	<b>P-Wert</b>
<b><i>JAK</i>-2 WT</b>	29/35 (83%)	12/16 (75%)	17/19 (89%)	0.01
<b><i>JAK</i>-2 V617F MUT</b>	6/35 (17%)	4/16 (25%)	2/19 (11%)	

In der MPN-Kontrollgruppe zeigte sich die *JAK2*-V617F-Mutation bei 14 der 20 Patienten (70%). Drei Patienten hatten gleichzeitig eine Mutation in *SRSF2* und in *JAK2*. Es handelte sich um drei Fälle einer PMF, darunter auch die zwei

PMF-Fälle, die ursprünglich aufgrund von Monozytose als CMML klassifiziert worden waren.

Ein Patient der MDS-Kontrollgruppe zeigte die *JAK2*-V617F-Mutation (4,5%). Im Detail handelte es sich um eine RCMD, der Patient hatte einen *SRSF2*-Wildtyp-Mutationsstatus.

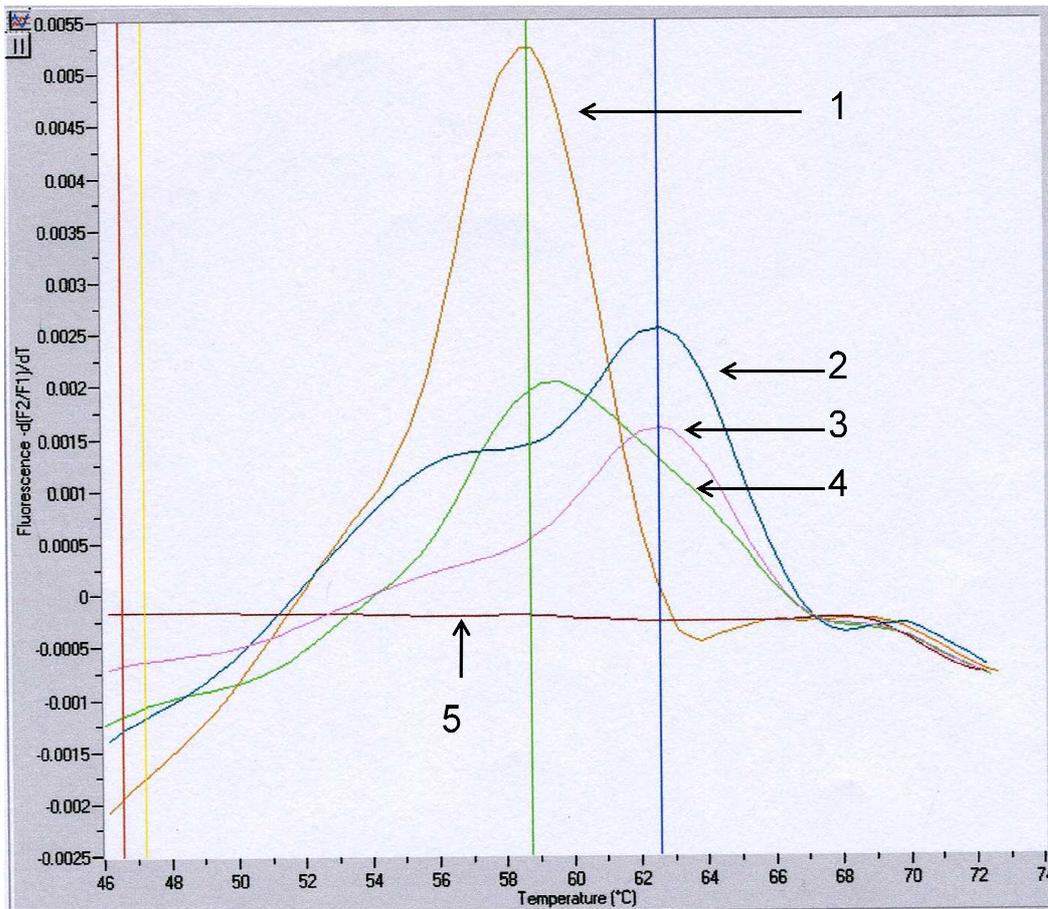


Abbildung 23: *JAK2*-Schmelzpunktanalyse

Kurve 1 (ocker): *JAK2* V617V Wildtyp-Kontrolle; Kurve 2 (blau): *JAK2* V617F Positivkontrolle; Kurve 3 (lila): Probe mit LNA-Sonde; Kurve 4 (grün): Probe ohne LNA-Sonde; Kurve 5 (braun): Negativkontrolle.

Die Probe mit zugefügter LNA-Sonde zeigt ein Maximum bei ca. 62,5  $^{\circ}C$ , passend zur *JAK2* V617F Positivkontrolle und zeigt dadurch die Mutation an.

X-Achse: Temperatur in  $^{\circ}C$ ; Y-Achse: Fluoreszenzwert

### 3.4.2 Beschreibung der *JAK2*-positiven CMML-Fälle

Die sechs Patienten mit *JAK2*-Mutation wiesen zum Zeitpunkt der Knochenmarksbiopsie im Vergleich zu den *JAK2*-negativen CMML-Fällen im Durchschnitt höhere Leukozytenwerte im peripheren Blut auf (48,6 vs. 24,1 x 10<sup>9</sup> pro Liter)[1]. Vier der sechs Patienten konnte ein myeloproliferativer Typ einer CMML zugeordnet werden[1], interessanterweise genau den vier Patienten, die gleichzeitig auch eine *SRSF2*-Mutation trugen. Zwei der sechs Patienten mit *JAK2*-Mutation hatten Mastzellinfiltrate im Knochenmark gezeigt[1]. Somit war die Mutation bei zwei der insgesamt drei Patienten mit einer SM-AHNMD nachweisbar[1]. Darunter war auch der Patient, der die *JAK2*-Mutation erst im Krankheitsverlauf erworben hatte[1].

Im Vergleich zu den *JAK2*-negativen CMML-Fällen, zeigten die *JAK2*-positiven Fälle keine einheitlichen Unterschiede in der Morphologie des Knochenmarks[1]. Es zeigte sich durchweg ein hyperzelluläres Bild (alle > 80%). Dysplasiezeichen waren variabel in allen myeloischen Zellreihen vorhanden. Mit Ausnahme des Falls mit erworbener *JAK2*-Mutation und Mastozytose, wurde bei allen Fällen nur milde (Grad 1) oder keine Fibrose beobachtet[1]. Die Megakaryozyten waren entweder normal oder dysplastisch verkleinert mit hypolobulierten Kernen. Myeloproliferativ wirkende, vergrößerte Megakaryozyten mit hypersegmentierten Kernen wurden nicht beobachtet. Die CD14 positiven Zellen waren bei allen Biopsien vermehrt (10% oder mehr).

### 3.5 Assoziierte systemische Mastozytose

Die Schmelzpunktanalyse zur Detektion der *KIT* D816V-Mutation identifizierte die Mutation bei zwei der drei Fälle mit SM-AHNMD[1]. Der in Abschnitt 3.4 beschriebene Patient, dessen *JAK2*-Mutation erst in Verlaufsbiopsien identifiziert wurde, zeigte somit Mutationen in allen drei untersuchten Genen [1](Abbildung 14). Der zweite Patient mit *KIT*-Mutation hatte zusätzlich auch die *JAK2*-Mutation, wies aber die *SRSF2*-Wildtyp-Sequenz im Kodon 95 auf[1]. Der dritte Patient mit einer Mastozytose zeigte keine Mutationen in den drei untersuchten Genen[1].

## 4. Diskussion

### 4.1 *SRSF2*-Mutationsanalyse

#### 4.1.1 *SRSF2*-Mutationsnachweis aus FFPE-Knochenmarksbiopsien

In dieser Studie konnte eine Methode etabliert werden, mit der Mutationen im *SRSF2*-Gen zuverlässig in Knochenmarksbiopsien nachgewiesen werden können[1]. Die in dieser Studie analysierte DNA wurde aus EDTA-entkalkten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien extrahiert[1]. Obwohl die Prozesse zu Strangbrüchen an der DNA führen[35], konnte der Mutationsnachweis bei einem Großteil der untersuchten Biopsien durchgeführt werden, lediglich vier Proben mussten aufgrund zu stark fragmentierter DNA von den Analysen ausgeschlossen werden[1]. Wie auch schon vorangegangene Studien zeigten[67], stellt DNA aus EDTA-entkalkten, formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien ein zuverlässiges Material für molekulare Untersuchungen dar[1].

Entscheidend für die erfolgreiche Etablierung einer molekularpathologischen Methode scheint unter anderem eine sorgfältige Extraktionsmethode zu sein[35]. In unserer Studie wurde mit Xylol entparaffiniert und der enzymatische Gewebeerddau anschließend über volle 48 Stunden durchgeführt, um eine möglichst große DNA-Ausbeute aus den relativ geringen Gewebemengen der Knochenmarksstanzen zu erhalten[1]. Für die anschließende Aufreinigung wurde auf die Verwendung kommerziell erhältlicher Kits und maschineller Verfahren verzichtet und eine klassische Phenol-Chloroform-Aufreinigung durchgeführt[1]. Dadurch konnte die Menge an ddH<sub>2</sub>O zum abschließenden Lösen der DNA frei gewählt werden und die für die Analysen erforderliche Konzentration von 50 ng/μl auch bei geringer DNA-Menge in der Regel erreicht werden. Zusätzlich entscheidend ist die Wahl einer PCR mit geringer Produktgröße, dass die Amplifikation auch im Falle stark fragmentierter DNA möglich ist[57]. Durch die in dieser Studie gewählte Amplifikatlänge von 145 bp konnten die Analysen in einem Großteil der Fälle durchgeführt werden[1].

Vor allem eine geringe Gewebemenge im Paraffinblock sowie ein hohes Alter der Biopsie Faktoren stellten Faktoren dar, die die Extraktion suffizienter DNA erschwerten[58,68].

Für die molekulare Diagnostik bei myeloischen Neoplasien werden in erster Linie peripheres Blut oder Knochenmarksaspirate verwendet[57]. Dennoch konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Knochenmarksbiopsien eine Alternative für den *SRSF2*-Mutationsnachweis bei der CMML und verwandten myeloischen Neoplasien sein können[1]. Dies erlaubte zudem die Untersuchung des Einflusses von *SRSF2*-Mutationen auf die Morphologie des Knochenmarks[1]. Ein entscheidender Vorteil der Methode ist außerdem die Tatsache, dass so auch im Falle von leerem Mark ("punctio sicca") eine molekulare Diagnostik am Knochenmark möglich ist[35]. Dadurch dass molekulare Analysen auch an archivierten, paraffineingebetteten Knochenmarksbiopsien durchgeführt werden können, bietet diese Methode eine hervorragende Möglichkeit, um größere retrospektive Analysen durchzuführen und so den Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf den Krankheitsverlauf und die Prognose weiter untersuchen zu können[1,57].

#### 4.1.2 *SRSF2*-Mutationsfrequenz bei der CMML

Die bidirektionale Sanger-Sequenzierung identifizierte *SRSF2*-Mutationen bei 16 der 36 Patienten mit CMML (44%)[1]. Trotz der vergleichsweise kleinen Studiengruppe in dieser Studie, ist die Mutationsfrequenz vergleichbar mit Daten aus aktuell publizierten Studien mit größeren Patientenkohorten, die *SRSF2*-Mutationsfrequenzen von 47%[50], 46%[25] oder 40%[51] bei der CMML identifizierten[1].

Alle in dieser Studie identifizierten Mutationen im *SRSF2*-Gen waren Punktmutationen im Kodon 95 in Exon 1[1]. Die Verteilung der unterschiedlichen Mutationen ist vergleichbar mit der Verteilung in der bisher größten publizierten Kohorte von Meggendorfer et al[1,50]. Die beschriebene p.P95T-Mutation sowie die bisher beschriebenen Insertionen, Deletionen oder Duplikationen wurden nicht identifiziert. Der Grund hierfür ist zum einen

vermutlich die Größe der untersuchten Kohorte. Zum anderen wurden die Primer für die PCR so gewählt, dass ein 145 bp langer Genabschnitt amplifiziert wurde, was die Analyse auch bei stark fragmentierter DNA möglich machte. Die Bindungsstelle des Reverse-Primers lag dabei im Bereich der beschriebenen Deletionen[50,51], wodurch die mutierte DNA nicht amplifiziert worden wäre.

#### 4.1.3 RFLP-Analyse als *SRSF2*-Mutationsnachweis

In dieser Studie wurde zusätzlich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung noch ein Mutationsnachweis mittels RFLP-Analyse etabliert[1]. Die RFLP-Analyse detektierte zuverlässig die drei häufigsten Mutationen p.P95H, p.P95L und p.P95R, insgesamt also 15 der 16 Mutationen (94%)[1]. Lediglich der einzelne Fall mit der p.P95A-Mutation konnte nicht detektiert werden[1]. Angewandt auf bisher publizierte größere Kohorten hätte die RFLP-Analyse theoretisch auch 92%[50,69], 91%[51] oder 100%[43] der dort insgesamt identifizierten Mutationen erkannt.

#### 4.1.4 Die Rolle von *SRSF2*-Mutationen bei der Pathogenese der CMML

Die Rolle von Mutationen im *SRSF2*-Gen bei der Pathogenese der CMML ist aktuell Gegenstand der Forschung. In der vorliegenden Studie konnten von fünf Patienten zusätzlich Follow-up-Biopsien auf *SRSF2*-Mutationen untersucht werden[1]. Bei keinem der Patienten änderte sich der *SRSF2*-Mutationsstatus im Krankheitsverlauf, was vermuten lässt, dass *SRSF2*-Mutationen ein eher frühes Ereignis in der Krankheitsentstehung darstellen[1]. Dies deckt sich mit bereits für MDS veröffentlichten Daten[54]. Aktuelle Übersichtsarbeiten für die CMML gehen davon aus, dass *SRSF2*-Mutationen zusammen mit anderen Mutationen die klonale Dominanz der hämatopoetischen Stammzellen induzieren und eine myelomonozytäre Hyperplasie bewirken. Durch weitere erworbene Mutationen wie zum Beispiel *RUNX1*, *NRAS* oder *KRAS* käme es dann zur abnormen Proliferation der Tumorzellen[29,56].

#### 4.1.5 *SRSF2*-Mutationsfrequenz in den Kontrollgruppen

In der MPN-Kontrollgruppe wurden Mutationen im *SRSF2*-Gen bei 4 der 20 Patienten (20%) identifiziert[1]. Verglichen mit bisher veröffentlichten Daten über *SRSF2*-Mutationen bei myeloproliferativen Neoplasien (Yoshida et al: 1,9%[43]) zeigte sich insgesamt demnach eine deutlich höhere Mutationsfrequenz. Alle vier Fälle mit Mutationen waren PMF-Fälle[1], bei den untersuchten Fällen mit PV, ET, CML oder unklassifizierten MPN wurden keine Mutationen im *SRSF2*-Gen entdeckt. Bei der PV und der ET spielen *SRSF2*-Mutationen in aktuellen Übersichtsarbeiten eine untergeordnete Rolle[70]. Im Gegensatz dazu scheinen *SRSF2*-Mutationen bei der PMF häufiger vorzukommen, eine vorangegangene Studie zeigte eine *SRSF2*-Mutationsfrequenz von 17% bei der PMF[71].

Zwei der *SRSF2*-positiven PMF-Fälle hatten durch eine periphere Monozytose auch die Diagnosekriterien für die CMML erfüllt[1]. Die Tatsache, dass Patienten mit einer PMF eine Monozytose entwickeln können, wurde bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben[32]. Daher wurden fünf Fälle aus dieser Studie ebenfalls auf *SRSF2*-Mutationen untersucht und bei zwei dieser Fälle eine Mutation identifiziert (40%)[1]. Somit zeigte sich in dieser Studie ein auffällig häufiges Auftreten von *SRSF2*-Mutationen bei PMF-Fällen mit Monozytose[1]. Ein möglicher Einfluss der *SRSF2*-Mutationen auf die Entwicklung einer Monozytose bei dieser Erkrankung wurde in bisherigen Studien nicht beschrieben[71,72], weitere Studien mit größeren Patientenzahlen sollten diese Fragestellung weiter untersuchen[1].

In der MDS-Kontrollgruppe wurde eine Mutation bei einem der 22 Patienten (4,5%) identifiziert[1]. Damit lag die Mutationsfrequenz etwas niedriger, als in vorangegangenen Studien. Diese beschrieben *SRSF2*-Mutationen von etwa 10-15% bei MDS-Patienten[43,53,54,73,74]. Insgesamt bestätigt dies aber, dass *SRSF2*-Mutationen bei MDS mit geringerer Häufigkeit als bei der CMML vorkommen.

## 4.2 *SRSF2*-Mutationsstatus

### 4.2.1 Korrelation des *SRSF2*-Mutationsstatus mit klinischen Parametern und Zytogenetik

In einer vorangegangenen Studie mit 275 Patienten hatten sich Assoziationen von Mutationen im *SRSF2*-Gen mit einem höheren Patientenalter und höheren Hämoglobinwerten gezeigt[50]. Eine weitere kleinere Studie zeigte ebenfalls Assoziationen mit einem höheren Patientenalter[75]. In dieser Studie, wie auch in anderen vorangegangenen Studien[51], konnten hingegen keine Assoziationen bezüglich Alter, Geschlecht, Blutbild und dem WHO-Subtyp gezeigt werden[1]. Der Grund dafür ist vermutlich die geringe Anzahl an untersuchten Patienten in dieser Studie, der Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf diese Parameter scheint aber nicht abschließend geklärt.

Zytogenetische Veränderungen kommen bei 20-40% der Patienten mit CMML vor[14] und scheinen zum Teil auch ein unabhängiger Risikofaktor für eine schlechtere Prognose zu sein[24,41,76]. In dieser Studie waren Daten zu zytogenetischen Veränderungen bei 23 der 36 CMML-Patienten vorhanden, sieben davon zeigten zytogenetische Aberrationen[1]. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Korrelation von Mutationen im *SRSF2*-Gen mit einem diploiden Karyotyp[1]. Dies bestätigte trotz der kleinen Studiengruppe die bis hierher publizierte Ergebnisse [50,76] und zeigte dadurch, dass *SRSF2*-Mutationen häufiger bei Patienten mit normalen Karyotyp vorzukommen scheinen. Dies lässt die Vermutung zu, dass *SRSF2*-Mutationen möglicherweise vor zytogenetischen Veränderungen schützen könnten. Aufgrund der Tatsache, dass bestimmte zytogenetische Aberrationen einen negativen Einfluss auf die Prognose zu haben scheinen[24,41,76], kann auch daher ein möglicher positiver prognostischer Einfluss von *SRSF2*-Mutationen diskutiert werden

#### 4.2.2 Korrelation des *SRSF2*-Mutationsstatus mit der Knochenmarksmorphologie

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Untersuchung, ob das Vorhandensein von *SRSF2*-Mutationen einen Einfluss auf die histopathologische Morphologie des Knochenmarks hat[1]. Die Untersuchung der Mutation in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien erlaubte eine direkte Korrelation von Knochenmarksmorphologie und Genotyp. Es zeigten sich keine Assoziationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit histologischen Veränderungen des Knochenmarks[1]. Aufgrund der kleinen Patientenzahlen sollte diese Fragestellung in Studien mit größeren Kohorten weiter untersucht werden. Folgt man allerdings der Vermutung, dass *SRSF2*-Mutationen ein frühes Ereignis in der Entstehung der Neoplasie darstellen und die Morphologie der Erkrankung eher durch sekundäre Mutationen bestimmt wird[29], wäre es auch möglich, dass *SRSF2*-Mutationen keinen direkten Einfluss auf die Morphologie des Knochenmarks haben.

#### 4.2.3 Korrelation des *SRSF2*-Mutationsstatus mit der Überlebensrate

Bei chronisch verlaufenden Erkrankungen wie der CMML, aber auch bei anderen chronisch myeloischen Neoplasien wie MDS oder MPN, ist die Therapieentscheidung stark von der Prognose der Patienten abhängig. Aggressive Therapieschemata werden in der Regel nur gewählt, wenn eine schlechte Prognose zu erwarten ist[6]. Daher ist die Entwicklung von Prognosescores sowie die Untersuchung von Risikofaktoren Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Aufgrund der hohen Rate an *SRSF2*-Mutationen bei der CMML ist daher auch zu klären, inwiefern die Mutationen Einfluss auf die Prognose der Patienten nehmen.

Der mittlere Überlebenzeitraum aller Patienten in dieser Studie lag bei 890 Tagen und damit im Bereich der von Meggendorfer et al. publizierten Kohorte[1]. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf die Überlebensrate oder die Rate an Transformationen in eine sekundäre AML[1]. Die Ergebnisse vorangegangener Studien dazu sind uneinheitlich. Eine große Studie von Itzykson et al. hatte einen negativen Einfluss von *SRSF2*-

Mutationen auf die Überlebensrate bei der CMML gezeigt[25], ebenso wurde ein negativer Einfluss bei jüngeren Patienten beobachtet[77]. Dahingegen ergab sich in zwei weiteren Studien mit großen Kohorten kein Einfluss von *SRSF2*-Mutationen auf die Prognose[50,51]. In Zusammenschau bleibt die Frage somit ungeklärt, inwiefern *SRSF2*-Mutationen als Risikofaktor bei der CMML gewertet werden können.

Im Gegensatz dazu scheint die Rolle bei anderen myeloischen Neoplasien eindeutig. Bei MDS sowie bei der PMF zeigten mehrere unabhängige Studien einen negativen Einfluss auf die Überlebensrate sowie die Transformationsrate in eine AML[53-55,71]. Auch bei sekundärer AML, entwickelt aus MPN, wurde eine erhöhte Rate an *SRSF2*-Mutationen entdeckt[78].

Computeranalysen zeigten, dass Mutationen im Kodon 95 einen Einfluss auf die Proteinstruktur und dadurch auf die Proteinfunktion haben könnten[50,79]. Aus Studien mit Tiermodellen ergab sich, dass *SRSF2* zusätzlich zu den Funktionen beim Spleißen und alternativen Spleißen auch eine wichtige Funktion zur Erhaltung der genomischen Stabilität zu haben scheint[80,81]. In der Studie von Yoshida et al. waren *SRSF2*-Mutationen mit mehr zusätzlichen Mutationen assoziiert, als andere Spleißgene[43]. Die Tatsache, dass ein Verlust der *SRSF2*-Funktion den Erwerb weiterer Mutationen wahrscheinlicher machen könnte, wäre ein möglicher Ansatz zur Erklärung, warum *SRSF2*-Mutationen einen negativen Einfluss auf die Überlebensraten haben könnten[51]. Dennoch bliebe aber unklar, warum dies nur bei MDS und MPN der Fall wäre, nicht aber bei der CMML.

## **4.3 Diagnostischer Nutzen der *SRSF2*-Mutationsanalyse**

### **4.3.1 Klinische und histologische Klassifikation**

Ein Hauptziel der Studie war die Untersuchung der Fragestellung, inwiefern der Nachweis von *SRSF2*-Mutationen bei der Diagnosestellung der CMML hilfreich sein kann[1]. Die Diagnose CMML ist schwierig zu stellen und nur in Zusammenschau von Klinik, Blutuntersuchungen, Histologie, Zytogenetik und Molekularpathologie möglich[18]. Mit Ausnahme der persistierenden Monozytose gibt es kein krankheitsdefinierendes, positives

Diagnosekriterium[1,14]. Insbesondere das Fehlen einer krankheitsspezifischen Knochenmarksmorphologie sowie das Fehlen beweisender molekularer Marker erschweren die Diagnosefindung oftmals[16]. Im Laufe der klinischen und histologischen Klassifikation mussten mehrere Patienten ausgeschlossen werden, weil die Diagnose CMML nicht mit Sicherheit gestellt werden konnte. Ebenso mussten mehrere Patienten anderen Krankheitsgruppen zugeordnet werden, als ihre ursprüngliche klinische oder pathologische Diagnose hätte vermuten lassen[1]. Die Knochenmarksmorphologie der CMML-Patienten zeigte größtenteils ein einheitliches Bild mit einer deutlichen Hyperzellularität, variablen Dysplasiezeichen sowie einer vermehrten Anzahl an CD14-positiven Zellen[1]. Dennoch ist diese Morphologie nicht beweisend für eine CMML, da auch die gängigen Differentialdiagnosen diese Morphologie zeigen können und es kein pathognomonisches Zeichen für die CMML gibt[16]. Zudem kann die Diagnose nicht allein anhand der Knochenmarksmorphologie gestellt werden, das Diagnosekriterium der persistierenden Monozytose bezieht sich auf das periphere Blut. Fehlt die periphere Monozytose, kann selbst bei vermehrten und atypischen Monozyten im Knochenmark die Diagnose nicht gestellt werden. In Fällen mit ausgeprägter Dysplasie kann diese auch zu peripheren Zytopenien führen, wodurch dieses Diagnosekriterium gegebenenfalls nicht erfüllt wird[18]. Andererseits kann beispielsweise eine andauernde reaktive Monozytose durch Dysplasiezeichen im Knochenmark fälschlicherweise zur Diagnose CMML leiten[18]. Diese Tatsachen verdeutlichen, dass die Suche nach weiteren diagnostischen Markern bei der CMML einen großen Stellenwert haben sollte. Mit Hilfe von Next-Generation Sequencing können in Zukunft große Kohorten auf eine große Anzahl an weiteren Genen untersucht werden[1].

#### 4.3.2 *SRSF2*-Mutationsnachweis in der CMML-Diagnostik

In den letzten Jahren konnten Mutationen in Genen, die wichtig für den Spleißvorgang sind, als neue Mechanismen bei der Entstehung hämatologischer Neoplasien identifiziert werden[43]. Sowohl zum Verständnis der Pathogenese, als auch zur Diagnostik, Prognoseabschätzung und möglicherweise Therapie dieser Erkrankungen stellen diese Entdeckungen

einen wichtigen Meilenstein dar[1]. Eines dieser Gene ist *SRSF2*, welches zusammen mit *TET2* und *ASXL1* zu den am häufigsten bei der CMML mutierten Genen gehört[1]. In dieser Studie sollte der Nutzen der *SRSF2*-Mutationsanalyse in der Diagnostik der CMML untersucht werden[1].

Diese wie auch vorangegangene Studien zeigten, dass bei etwa der Hälfte der CMML-Patienten Mutationen in *SRSF2* nachweisbar sind. Somit kann durch die *SRSF2*-Mutationsanalyse mit einer Sensitivität von etwa 50% allein eine CMML weder bewiesen noch ausgeschlossen werden. Durch die Tatsache, dass *SRSF2*-Mutationen bei gängigen Differentialdiagnosen, wenn auch mit geringerer Häufigkeit, gefunden werden, kann ein positiver *SRSF2*-Mutationsstatus diese Differentialdiagnosen somit nicht ausschließen. Verglichen mit den gängigen Differentialdiagnosen MDS und MPN ergab sich in dieser Studie eine Spezifität von lediglich 88,1%[1].

Dennoch kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse, vor allem in bestimmten Konstellationen, eine entscheidende Hilfe bei Diagnosestellung oder -ausschluss einer CMML sein. Eine periphere Monozytose, das wichtigste Diagnosekriterium für die CMML, kann auch zahlreiche nicht-neoplastische Ursachen haben[16]. Keine der in dieser Studie untersuchten reaktiv veränderten Knochenmarksbiopsien zeigte jedoch *SRSF2*-Mutationen[1]. Für Fälle mit anhaltender peripherer Monozytose, bei denen im Knochenmark nur wenige oder keine Dysplasiezeichen sichtbar sind, kann ein positiver *SRSF2*-Mutationsstatus auf eine neoplastische Ursache hindeuten[1]. Eine weitere gängige Methode zur Klärung der Frage einer neoplastischen Ursache, ist auch die Untersuchung auf zytogenetische Aberrationen. Bei der CMML kommen derartige Veränderungen lediglich in 20-40% der Fälle vor[14]. Die Tatsache, dass *SRSF2*-Mutationen signifikant häufiger in der Untergruppe mit normalen Karyotyp vorkamen, macht die *SRSF2*-Mutationsanalyse in dieser Untergruppe besonders hilfreich[1].

Geht es um die Differentialdiagnose CMML vs. MDS, kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse ebenfalls Hinweise geben. Bei verschiedenen MDS scheint die *SRSF2*-Mutationsfrequenz deutlich niedriger zu liegen als bei der CMML[73], wodurch ein positiver *SRSF2*-Mutationsstatus eine CMML

wahrscheinlicher macht[82]. Auch in Fällen, in denen eine ET aufgrund von Klinik, Blutbild und Knochenmarksmorphologie nicht eindeutig abgegrenzt werden kann, kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse diagnostisch hilfreich sein, da das Auftreten von *SRSF2*-Mutationen bei der ET aktuell nicht beschrieben wird[70,83]. Bei der CNL, einer seltenen Erkrankung aus der Gruppe der *BCR-ABL*-negativen myeloproliferativen Neoplasien, die durch eine periphere Neutrophilie und eine Hyperplasie der granulozytären Vorläuferzellen im Knochenmark charakterisiert ist[84,85], wurden *SRSF2*-Mutationen bei 21% der Patienten identifiziert[86]. Daher beschrieben Meggendorfer et al, dass *SRSF2*-Mutationen auch bei der Differentialdiagnose CMML vs. CNL Hinweise geben können[86].

Weniger nützlich scheint die *SRSF2*-Mutationsanalyse hingegen bei der Differentialdiagnose CMML vs. aCML zu sein, da auch bei 40% der aCML-Patienten *SRSF2*-Mutationen beobachtet wurden[86]. Ebenso von eingeschränktem Nutzen ist die *SRSF2*-Mutationsanalyse bei der Differentialdiagnose präfibrotische PMF (vgl. 4.3.4)[1].

#### 4.3.3 Nutzen der RFLP-Analyse in der Diagnostik

Vorangegangene Studien mit großen Patientenkohorten verwendeten die bidirektionale Sanger-Sequenzierung zur *SRSF2*-Mutationsanalyse bei der CMML[25,50,51]. Diese Methode ist eher zeitaufwändig und kostenintensiv und daher nicht uneingeschränkt für die Routinediagnostik geeignet. Diese Problematik war auch von zwei anderen aktuellen Studien erkannt worden, die eine Schmelzpunktanalyse zur *SRSF2*-Mutationsdiagnostik bei MDS entwickeln konnten[87,88].

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war ebenfalls die Entwicklung einer schnellen und kostengünstigen Methode zur *SRSF2*-Mutationsanalyse. Für diagnostische Zwecke ist es in aller Regel ausreichend zu wissen, ob eine Mutation vorliegt oder ob es sich um Wildtyp-DNA handelt. Mit der RFLP-Analyse konnte ein Großteil der Mutationen zuverlässig detektiert werden (vgl. 4.1.3)[1]. Daher eignet sich diese schnelle und kostengünstige Methode sowohl als Screening-Methode in der Diagnostik als auch zur Analyse von großen

Probenzahlen zu Forschungszwecken[1]. Proben, die die für die Mutationen charakteristische Bande zeigen, können mittels Sanger-Sequenzierung im Anschluss genauer untersucht werden.

#### 4.3.4 Grenzfälle zwischen der CMML und der präfibrotischen PMF

Interessanterweise wurden in dieser Studie einige Überlappungen zwischen der CMML und der PMF in ihrer präfibrotischen Phase beobachtet[1]. Insbesondere die Tatsache, dass auch Patienten mit einer PMF eine Monozytose entwickeln können[32], macht die Differentialdiagnose unter Umständen schwierig[1]. In dieser Studie fiel eine hohe Rate an *SRSF2*-Mutationen bei PMF-Fällen mit Monozytose auf[1]. Sowohl die beiden reklassifizierten PMF-Fälle mit Monozytose als auch zwei aus fünf Fällen aus der Studie von Boiocchi et al.[32] waren *SRSF2*-positiv[1]. Diese Fälle stellen Grenzfälle zwischen den beiden Erkrankungen dar[1]. Einerseits lässt diese Beobachtung die Vermutung zu, dass *SRSF2*-Mutationen pathogenetisch an der Entwicklung der Monozytose und einer CMML-ähnlichen Knochenmarksmorphologie[32] bei der PMF beteiligt sein könnten[1]. Andererseits ist die *SRSF2*-Mutationsanalyse dadurch aber wenig hilfreich bei der schwierigen Differentialdiagnose zwischen diesen beiden Erkrankungen. Grenzfälle zwischen der CMML und der präfibrotischen PMF sollten in weiteren Studien mit größeren Patientengruppen untersucht werden[1]. Dahingegen kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse gegebenenfalls dabei behilflich sein, eine präfibrotische PMF von einer ET abzugrenzen[1]. Die Mutationen treten bereits früh im Krankheitsverlauf der präfibrotischen PMF auf[1], bei der ET scheinen sie dahingegen nicht vorzukommen[83].

## 4.4 *JAK2*-Mutationsanalyse

### 4.4.1 *JAK2*-Mutationsfrequenz in der Studiengruppe

Die Entdeckung der aktivierenden *JAK2*-V617F-Mutation bei den myeloproliferativen Neoplasien PV, ET und PMF lieferte für diese Erkrankungen eine hilfreiche diagnostischen Methode und half entscheidend bei der Erforschung der Pathogenese dieser Erkrankungen. Da vor allem die PMF in ihrer zellulären Phase eine wichtige Differentialdiagnose zur CMML darstellt,

wurde in der vorliegenden Studie auch bei allen Proben eine *JAK2*-Mutationsanalyse durchgeführt[1]. Wie bereits in vorangegangenen Studien beschrieben[61,67], lieferten in der vorliegenden Studie formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Knochenmarksbiopsien suffizientes Material zur *JAK2*-Mutationsanalyse, lediglich bei einem Fall konnte die Analyse nicht durchgeführt werden[1]. Die Schmelzpunktanalyse identifizierte *JAK2*-Mutationen bei 17% der CMML-Patienten[1]. Damit lag die Mutationsfrequenz etwas höher als in bisher veröffentlichten Studien. In drei Studien mit jeweils über 250 Patienten wurden Frequenzen von 7-8%[25,50,89] beobachtet, zum Teil wurden aber auch Raten von 2,5%[90], 10,2%[91] oder 13%[92] beschrieben.

Vier der sechs Patienten hatten zusätzlich zur *JAK2*-Mutation auch eine Mutation im *SRSF2*-Gen[1]. Insgesamt traten *SRSF2*-Mutationen häufiger in der Untergruppe mit *JAK2*-Mutationen auf[1]. Dies passt zur bereits beschriebenen Beobachtung, dass *SRSF2*-Mutationen häufig mit anderen Mutationen kombiniert zu sein scheinen[43,50]. Interessanterweise wurde bei einem Patienten die *JAK2*-Mutation erst in Verlaufsbiopsien gefunden, bei Diagnosestellung war der *JAK2*-Mutationsstatus Wildtyp[1]. Dies lässt vermuten, dass die Mutation erst im Krankheitsverlauf erworben wurde[1]. Bei diesem Patienten konnte auch eine *SRSF2*-Mutation identifiziert werden, diese war bereits bei Diagnosestellung vorhanden[1]. Auch wenn es sich nur um einen Einzelfall handelt, könnte diese Konstellation die These stützen, dass *SRSF2*-Mutationen ein frühes Ereignis darstellen[29] und möglicherweise den Erwerb weiterer Mutationen begünstigen könnten[51]. Weitere Mutationen, wie in diesem Fall die *JAK2*-Mutation, könnten dann den weiteren Phänotyp der Erkrankung bestimmen[29]. Bei diesem Fall handelte es sich um einen Patienten, der auch eine SM-AHNMD entwickelt hatte[1].

#### 4.4.2 Einfluss von *JAK2*-Mutationen auf den Krankheitstyp und die Knochenmarksmorphologie

Die *JAK2*-positiven CMML-Fälle wiesen durchschnittlich höhere Leukozytenwerte auf als die negativen Fälle[1]. Die vier Fälle mit Mutationen in

*JAK2* und *SRSF2* konnten alle dem myeloproliferativen Typ der CMML zugeordnet werden[1]. Die Tatsache, dass *JAK2*-Mutationen mit einem myeloproliferativen Typ der Erkrankung assoziiert sein könnten, wurde bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben[91]. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die aktivierende *JAK2*-Mutation die Tumorzellen auch bei CMML-Patienten zur Proliferation anregt und sich dadurch ein myeloproliferativer Phänotyp entwickelt.

Im Gegensatz zum klinischen Phänotyp konnten in dieser Studie keine Assoziationen von *JAK2*-Mutationen mit der Knochenmarksmorphologie beobachtet werden[1]. Da die *JAK2*-Mutation als charakteristisch für die myeloproliferativen Neoplasien gilt, hätte auch erwartet werden können, dass *JAK2*-positive CMML-Fälle eine derartige Knochenmarksmorphologie aufweisen. Die *JAK2*-positiven Fälle zeigten im Vergleich zu den *JAK2*-negativen Fällen aber keine auffälligen Unterschiede[1]. Insbesondere wurden keine vergrößerten Megakaryozyten mit hypersegmentierten Kernen oder ein erhöhter Grad an Fibrose beobachtet[1], wie es in der von Pich et al. veröffentlichten Studie beschrieben wurde[91]. Der Grund hierfür könnte zum einen die geringe Anzahl an Proben sein. Zum anderen wurden in dieser Studie zwei Fälle, die eine derartige Morphologie zeigten und die Diagnosekriterien für die CMML erfüllt hatten, als präfibrotische PMF klassifiziert (vgl. 3.1.2)[1].

#### 4.4.3 *JAK2*-Mutationsanalyse in den Kontrollgruppen

Die aktivierende *JAK2*-Mutation ist charakteristisch für die myeloproliferativen Neoplasien, sie kommt bei so gut wie allen Fällen von PV und etwa der Hälfte der Fälle von ET und PMF vor[4]. In dieser Studie wurde die Mutation in einer heterogenen Gruppe von 20 MPN-Patienten untersucht und die Mutation bei 70% identifiziert. Bei den *JAK2*-negativen Fällen handelte es sich um zwei PMF-Fälle, eine CML sowie drei nicht weiter klassifizierte MPN. Somit liegen die Ergebnisse der *JAK2*-Mutationsanalyse im erwarteten Rahmen.

In der MDS-Kontrollgruppe wurde die *JAK2*-Mutation bei einem Patienten identifiziert (4,5%). Dies deckt sich mit Daten aus aktuellen Übersichtsarbeiten

und zeigt, dass die Mutation bei MDS, mit Ausnahme der RARS-T, selten vorzukommen scheint[93].

## **4.5 Assoziierte systemische Mastozytose**

### 4.5.1 *KIT*-Mutationsanalyse

Bei drei CMML-Fällen wurde zusätzlich eine Mastozytose diagnostiziert[1]. Diese Kombination wird als Systemische Mastozytose mit assoziierter klonaler hämatologischer Nicht-Mastzellerkrankung bezeichnet (SM-AHNMD)[66]. Die CMML stellt eine der häufigsten myeloischen Neoplasien dar, bei der diese Kombination (SM-CMML) auftritt[1,94]. Vorangegangene Studien identifizierten die *KIT*-D816V-Mutation bei einer hohen Anzahl an SM-AHNMD-Fällen[95], am häufigsten bei SM-CMML-Fällen[96]. Interessanterweise wurde die *KIT*-Mutation dabei sowohl in den Mastzellanteilen als auch den leukämischen myelomonozytären Zellen entdeckt, was darauf hindeutet, dass beide Erkrankungsanteile aus derselben mutierten Vorläuferzelle entstehen[96,97]. Wie bereits beschrieben, konnte die Mutationsanalyse an DNA aus FFPE-Knochenmarksbiopsien durchgeführt werden[61,96]. Zwei der drei SM-CMML-Fälle trugen die *KIT*-Mutation, wodurch die Ergebnisse trotz der kleinen Fallzahl mit vorangegangenen Studien vergleichbar waren und zeigten, dass die Mutation mit hoher Frequenz bei dieser Erkrankungskombination vorzukommen scheint[1,95,96]. *KIT*-Mutationen bei CMML-Fällen ohne assoziierte Mastozytose scheinen sehr selten zu sein (4%[98]), weshalb diskutiert werden kann, inwiefern *KIT*-Mutationsanalysen bei CMML-Patienten im Rahmen eines Screenings auf eine mögliche assoziierte Mastozytose eingesetzt werden könnten[98].

### 4.5.2 *SRSF2*- und *JAK2*-Mutationsanalyse der Mastozytose-Fälle

Neuere Forschungsarbeiten zeigten, dass *SRSF2*-Mutationen in 24-36% bei Fällen von Systemischer Mastozytose zu finden sind[99,100]. In diesen Studien fiel auch insbesondere das häufige Vorhandensein von *SRSF2*-Mutationen bei Fällen von SM-CMML auf[99,100], meist in Kombination mit *KIT*- und *TET2*-Mutationen[100].

Einer der drei SM-CMML-Fälle dieser Studie zeigte zusätzlich zur *KIT*-Mutation auch eine *SRSF2*-Mutation[1]. Ähnlich wie bereits für die CMML beschrieben, scheinen *SRSF2*-Mutationen auch bei der SM-CMML ein eher frühes Ereignis im Krankheitsverlauf zu sein, wohingegen *KIT*-Mutationen eher später im Prozess der Krankheitsentstehung erworben werden[98]. Da die *KIT*-Mutation nur sehr selten bei CMML-Fällen ohne assoziierte systemische Mastozytose vorzukommen scheint, liegt die Vermutung nahe, dass der Erwerb der *KIT*-Mutation zur Ausbildung der Systemischen Mastozytose bei CMML-Patienten führen könnte[98].

Die aktivierende *JAK2*-V617F-Mutation konnte bei zwei der drei SM-CMML-Fälle entdeckt werden, darunter auch der bereits beschriebene Fall, der die *JAK2*-Mutation erst im Krankheitsverlauf erworben hatte[1]. Verglichen mit vorangegangenen Studien, die eine Mutationsfrequenz von 4%[95] und 12,5%[99] bei der SM-AHNMD beschrieben, trat die *JAK2*-Mutation in dieser kleinen Kohorte sehr häufig auf. Beide *JAK2*-positiven Fälle waren auch *KIT*-positiv[1].

Eine vorangegangene Studie mit SM-PMF-Fällen zeigte, dass die *JAK2*-Mutation genau wie die *KIT*-Mutation in beiden Krankheitsanteilen vorhanden zu sein scheint[61]. Bei der Erforschung der Pathogenese dieser Erkrankungen ist auch insbesondere der Fall mit im Krankheitsverlauf erworbener *JAK2*-Mutation interessant. Mutationen in *KIT* und *SRSF2* waren bereits bei Diagnosestellung identifizierbar[1]. Mit Hilfe von Mikrodissektion sollten ebensolche Fälle in weiteren Studien genauer untersucht werden, um zu klären, in welchen Zellpopulationen die Mutationen im Krankheitsverlauf auftreten. Diskutiert werden sollte, ob in jedem Fall alle Tumorzellen auf eine gemeinsame Vorläuferzelle zurückgehen, oder ob sich möglicherweise aus einem *SRSF2*-positiven Vorläufer durch weitere Mutationen auch zwei Subpopulationen entwickeln könnten, eine durch Erwerb der *KIT*-Mutation verantwortlich für die Ausprägung einer Mastozytose und eine andere durch Erwerb der *JAK2*-Mutation verantwortlich für einen myeloproliferativen Typ der Erkrankung.

## 4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass der Nachweis von *SRSF2*-Mutationen bei der CMML in EDTA-entkalkten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Knochenmarksbiopsien zuverlässig durchführbar ist[1]. Mutationen im *SRSF2*-Gen treten mit einer Mutationsfrequenz von knapp 50% häufig bei der CMML auf[1]. Die beobachtete Mutationsfrequenz von 44% ist vergleichbar mit vorangegangenen Studien mit größeren Patientenkohorten[1]. Auch die Verteilung der unterschiedlichen Punktmutationen deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien[1]. Aufgrund des Primerdesigns, das die Amplifikation auch bei stark fragmentierter DNA möglich machte, konnten keine der beschriebenen Insertionen oder Deletionen identifiziert werden.

Die Mutationen scheinen ein frühes Ereignis in der Pathogenese der CMML zu sein und der Mutationsstatus scheint im Verlaufe der Erkrankung stabil zu bleiben[1]. Es konnten keine Assoziationen des Mutationsstatus mit klinischen Parametern oder der Knochenmarksmorphologie beobachtet werden[1]. Dahingegen konnte die Assoziation von *SRSF2*-Mutationen mit einem normalen Karyotyp bestätigt werden[1]. Weiterhin unklar bleibt die Fragestellung, inwiefern der *SRSF2*-Mutationsstatus als prognostischer Faktor bei der CMML gewertet werden kann[1].

Im Vergleich zu gängigen Differentialdiagnosen, kommen *SRSF2*-Mutationen bei der CMML häufiger vor. Dadurch kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse wichtige Hinweise in der Differentialdiagnostik dieser Erkrankungen liefern[1]. Insbesondere bei Fällen mit minimaler Dysplasie und fehlenden zytogenetischen Aberrationen kann ein positiver *SRSF2*-Mutationsstatus eine neoplastische Ursache aufdecken[1]. Die RFLP-Analyse identifizierte einen Großteil der bekannten *SRSF2*-Mutationen[1]. Damit kann sie als effiziente und kostengünstige Screening-Methode routinemäßig in der Diagnostik eingesetzt werden und erlaubt außerdem die Analyse großer Patientenkohorten zu Forschungszwecken[1].

Die *JAK2*-Mutationsanalyse identifizierte die Mutation bei 17% der Patienten mit CMML und ist daher nur von eingeschränktem Nutzen bei der Differentialdiagnose CMML vs. MPN[1]. Insbesondere konnten einige

Grenzfälle zwischen der CMML und der präfibrotischen PMF beobachtet werden[1]. Es wurde eine hohe Rate an *SRSF2*-Mutationen bei PMF-Patienten beobachtet, die auch eine Monozytose entwickelt hatten[1]. Inwiefern Mutationen im *SRSF2*-Gen zu der Entwicklung einer Monozytose bei dieser Erkrankung beitragen, sollte Gegenstand weiterer Studien sein[1].

*KIT*-Mutationen treten häufig bei Systemischer Mastozytose mit assoziierter klonaler hämatologischer Nicht-Mastzellerkrankung auf, die Kombination mit einer CMML scheint die häufigste zu sein[1]. *KIT*-Mutationen treten zusammen mit *SRSF2*- und *JAK2*-Mutationen auf und bieten eine gute Möglichkeit zur weiteren Erforschung der Pathogenese dieser Erkrankung[1].

Detaillierte klinische, morphologische und molekulare Analysen mit großen Patientenkohorten sind zukünftig notwendig, um die Rolle von *SRSF2*-Mutationen in der Diagnostik und Pathogenese der CMML weiter aufzuklären[1].

## 5. Zusammenfassung

Die CMML ist eine klonale und maligne Erkrankung der Hämatopoese. Sie zeigt sowohl Eigenschaften der myeloproliferativen als auch myelodysplastischen Erkrankungen zeigt und wird demnach in der WHO-Klassifikation den myelodysplastisch/myeloproliferativen Erkrankungen zugeordnet[2]. Die Diagnose wird anhand verschiedener klinischer, laborchemischer, morphologischer und genetischer Kriterien gestellt, darunter beispielsweise eine persistierende Monozytose im peripheren Blutbild[1]. Aufgrund vieler überlappender Eigenschaften ist eine Abgrenzung gängigen Differenzialdiagnosen wie MDS oder der PMF oft schwierig[1]. In Studien wurde bei der CMML eine Mutationsfrequenz von 40-50% im *SRSF2*-Gen beobachtet[1]. Das Ziel dieser Studie war die Etablierung einer Methode zur *SRSF2*-Mutationsanalyse an formalinfixierten, EDTA-entkalkten Knochenmarksbiopsien, die Korrelation der genetischen Ergebnisse mit klinischen und morphologischen Parametern sowie die Überprüfung, inwieweit eine *SRSF2*-Mutationsanalyse für die Diagnostik der CMML hilfreich sein kann[1].

36 Knochenmarksbiopsien von Patienten mit gesicherter CMML wurden auf die Mutation untersucht, dazu in Kontrollgruppen 20 Biopsien von MPN-Patienten, 22 von MDS-Patienten und 10 Biopsien mit normalen, bzw. reaktiv verändertem Knochenmark[1]. Zur DNA-Extraktion wurde mit Xylol und Ethanol entparaffiniert, mit Protease verdaut und mit Phenol-Chloroform aufgereinigt[1]. Ein Fragment von 145 bp, welches den Mutationshotspot im Kodon P95 in Exon 1 des *SRSF2*-Gens enthält, wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend eine Mutationsanalyse durch bidirektionale Sanger-Sequenzierung durchgeführt[1]. Zusätzlich wurde durch enzymatischen Verdau mit *Bsa*JI und anschließender Agarose-Gelelektrophorese eine RFLP-Analyse als weitere Methode zur *SRSF2*-Mutationsanalyse etabliert[1]. Ergänzend wurde bei allen Proben eine *JAK2*-Mutationsanalyse durch Allel-spezifische PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse durchgeführt[1].

Bei 16 der 36 CMML-Patienten (44%) wurde eine Mutation im *SRSF2*-Gen identifiziert[1]. In den Kontrollgruppen wurde eine Mutation bei vier MPN-Fällen (20%), bei einem MDS-Fall (4,5%) und bei keinem der normalen oder reaktiv veränderten Knochenmarksbiopsien beobachtet[1]. Die RFLP-Analyse identifizierte alle Mutationen mit Ausnahme einer einzigen p.P95A-Mutation[1]. Bei der CMML wurden keine Korrelationen des *SRSF2*-Mutationsstatus mit klinischen Parametern, der Knochenmarksmorphologie oder den Überlebensraten beobachtet[1]. Das Vorhandensein von *SRSF2*-Mutationen war mit einem normalen Karyotyp assoziiert[1]. Die *JAK2*-Mutation wurde bei fünf von 35 CMML-Fällen (17%) identifiziert[1]. Bei drei der 36 Patienten war die CMML mit einer systemischen Mastozytose assoziiert (SM-AHNMD)[1].

Die *SRSF2*-Mutationsanalyse konnte zuverlässig an formalinfixierten, EDTA-entkalkten Knochenmarksbiopsien durchgeführt werden[1]. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Mutationsfrequenz von 44% bei der CMML lag im Bereich vorausgegangener Studienergebnisse[25,50]. Somit stellt *SRSF2* eines der am häufigsten bei der CMML mutierten Gene dar[1,16,50]. Insbesondere in Fällen mit geringgradiger Dysplasie und normalem Karyotyp kann die *SRSF2*-Mutationsanalyse hilfreich für die Diagnosestellung bei der CMML sein[1]. Die RFLP-Analyse konnte einen Großteil der Mutationen zuverlässig detektieren und kann somit als effiziente und kostengünstige Screening-Methode in der Diagnostik eingesetzt werden[1]. Bei Fällen präfibrotischer PMF mit Monozytose konnte ebenfalls eine hohe *SRSF2*-Mutationsfrequenz beobachtet werden[1]. Die pathogenetische Rolle sowie die prognostische Bedeutung von *SRSF2*-Mutationen bei myeloischen Neoplasien ist nicht abschließend geklärt und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein[1].

## 6. Literaturverzeichnis

1. Federmann, B., Abele, M., Rosero Cuesta, D.S., Vogel, W., Boiocchi, L., Kanz, L., Quintanilla-Martinez, L., Orazi, A., Bonzheim, I. & Fend, F. (2014) The detection of SRSF2 mutations in routinely processed bone marrow biopsies is useful in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Human pathology* 45: 2471–2479.
2. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, (IARC Press, Lyon, France, 2008).
3. Janeway Charles A, T.P., Walport Mark, Shlomchik, Mark. (2001) Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition, 14-25 (Garland Science, New York, 2001).
4. Vardiman, J.W., Brunning, R., D., Arber, D.A., Le Beau, M.M., Porwit, A., Tefferi, A., Bloomfield, C.D. & Thiele, J. (2008) Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. 18-30. in *Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:18-30.*
5. Vardiman, J.W., Melo, J.V., Baccarani, M. & Thiele, J. (2008) Chronic myelogenous leukaemia, *BCR-ABL1* positive. 32-37. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:32-37.*
6. Herold, G.u.M. (2011) Innere Medizin, 20-112 (Herold, Gerd, Köln, 2011).
7. Lowenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A. (1999) Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 341: 1051-1062.
8. Jabbour, E. & Kantarjian, H. (2014) Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 89: 547-556.
9. 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. & Cross, N.C.P. (2005) Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106: 2162-2168.
10. Thol, F., Heuser, M. & Ganser, A. (2015) Myelodysplastische Syndrome. *Internist* 56: 364-373.
11. Brunning, R., D., Orazi, A., Germing, U., Le Beau, M.M., Porwit, A., Baumann, I., Vardiman, J.W. & Hellstrom-Lindberg, E. (2008) Myelodysplastic syndroms/neoplasms, overview. 88-93. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:88-93.*

12. Germing, U., Kobbe, G., Haas, R. & Gattermann, N. (2013) Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Dtsch Arztebl International* 110: 783-790.
13. Orazi, A. & Germing, U. (2008) The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 22: 1308-1319.
14. Orazi, A., Bennett, J.M., Germing, U., Brunning, R., D., Bain, B.J. & Thiele, J. (2008) Chronic myelomonocytic leukaemia. 76-79. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:76-79.*
15. Hyjek, E. & Vardiman, J.W. (2010) Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. 733-756. in *Jaffe, E.S., Harris, N.L., Vardiman, J.W., Campo, E. & Arber, D.A. Hematopathology, Saunders W.B./Elsevier, Philadelphia, PA, 2010.*
16. Parikh, S.A. & Tefferi, A. (2013) Chronic myelomonocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 88: 967-974.
17. Beran, M., Wen, S., Shen, Y., Onida, F., Jelinek, J., Cortes, J., Giles, F. & Kantarjian, H. (2007) Prognostic factors and risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia: validation study of the M.D. Anderson Prognostic Scoring System. *Leukemia & lymphoma* 48: 1150-1160.
18. Patnaik, M.M., Parikh, S.A., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2014) Chronic myelomonocytic leukaemia: a concise clinical and pathophysiological review. *British journal of haematology* 165: 273-286.
19. Germing, U., Kundgen, A. & Gattermann, N. (2004) Risk assessment in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia & lymphoma* 45: 1311-1318.
20. Onida, F., Kantarjian, H.M., Smith, T.L., Ball, G., Keating, M.J., Estey, E.H., Glassman, A.B., Albitar, M., Kwari, M.I. & Beran, M. (2002) Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 99: 840-849.
21. Germing, U., Strupp, C., Knipp, S., Kuendgen, A., Giagounidis, A., Hildebrandt, B., Aul, C., Haas, R., Gattermann, N. & Bennett, J.M. (2007) Chronic myelomonocytic leukemia in the light of the WHO proposals. *Haematologica* 92: 974-977.
22. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H., Sultan, C. & Cox, C. (1994) The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *British journal of haematology* 87: 746-754.
23. Germing, U., Strupp, C., Aivado, M. & Gattermann, N. (2002) New prognostic parameters for chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 100: 731-732; author reply 732-733.

24. Such, E., Germing, U., Malcovati, L., Cervera, J., Kuendgen, A., Della Porta, M.G., Nomdedeu, B., Arenillas, L., Luno, E., Xicoy, B., Amigo, M.L., Valcarcel, D., Nachtkamp, K., Ambaglio, I., Hildebrandt, B., Lorenzo, I., Cazzola, M. & Sanz, G. (2013) Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 121: 3005-3015.
25. Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Gelsi-Boyer, V., Meggendorfer, M., Morabito, M., Berthon, C., Ades, L., Fenaux, P., Beyne-Rauzy, O., Vey, N., Braun, T., Haferlach, T., Dreyfus, F., Cross, N.C., Preudhomme, C., Bernard, O.A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Schnittger, S., Birnbaum, D., Droin, N. & Solary, E. (2013) Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31: 2428-2436.
26. Patnaik, M.M., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Tefferi, A. & Solary, E. (2014) ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients. *Leukemia* 28: 2206-2212.
27. Tsai, S.-C., Shih, L.-Y., Liang, S.-T., Huang, Y.-J., Kuo, M.-C., Huang, C.-F., Shih, Y.-S., Lin, T.-H., Chiu, M.-C. & Liang, D.-C. (2015) Biological activities of RUNX1 mutants predict secondary acute leukemia transformation from chronic myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndromes. *Clinical Cancer Research* 21: 3541-3551.
28. Patnaik, M.M., Wassie, E.A., Lasho, T.L., Hanson, C.A., Ketterling, R. & Tefferi, A. (2015) Blast transformation in chronic myelomonocytic leukemia: Risk factors, genetic features, survival and treatment outcome. *Am J Hematol* 90: 411–416.
29. Itzykson, R. & Solary, E. (2013) An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 27: 1441-1450.
30. Bain, B.J., Gilliland, D.G., Horny, H.P. & Vardiman, J.W. (2008) Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB, FGFR1. 67-73. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:67-73.*
31. Vardiman, J.W., Bennett, J.M., Bain, B.J., Brunning, R., D, & Thiele, J. (2008) Atypical chronic myeloid leukaemia, BCR-ABL negative. 80-81. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:80-81.*
32. Boiocchi, L., Espinal-Witter, R., Geyer, J.T., Steinhilber, J., Bonzheim, I., Knowles, D.M., Fend, F. & Orazi, A. (2013) Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol* 26: 204-212.
33. Martiat, P., Michaux, J.L. & Rodhain, J. (1991) Philadelphia-negative (Ph-) chronic myeloid leukemia (CML): comparison with Ph+ CML and

- chronic myelomonocytic leukemia. The Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 78: 205-211.
34. Orazi, A., Chiu, R., O'Malley, D.P., Czader, M., Allen, S.L., An, C. & Vance, G.H. (2006) Chronic myelomonocytic leukemia: the role of bone marrow biopsy immunohistology. *Mod Pathol* 19: 1536-1545.
  35. Fend, F., Tzankov, A., Bink, K., Seidl, S., Quintanilla-Martinez, L., Kremer, M. & Dirnhofer, S. (2008) Modern techniques for the diagnostic evaluation of the trephine bone marrow biopsy: methodological aspects and applications. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 42: 203-252.
  36. Bacher, U., Haferlach, T., Schnittger, S., Kreipe, H. & Kroger, N. (2011) Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology* 153: 149-167.
  37. Ngo, N.-T., Lampert, I.A. & Naresh, K.N. (2008) Bone marrow trephine morphology and immunohistochemical findings in chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology* 141: 771-781.
  38. Rollins-Raval, M.A. & Roth, C.G. (2012) The value of immunohistochemistry for CD14, CD123, CD33, myeloperoxidase and CD68R in the diagnosis of acute and chronic myelomonocytic leukaemias. *Histopathology* 60: 933-942.
  39. Qubaja, M., Marmey, B., Le Tourneau, A., Haiat, S., Cazals-Hatem, D., Fabiani, B., Diebold, J., Marie, J.-P., Audouin, J., Geissmann, F. & Molina, T. (2009) The detection of CD14 and CD16 in paraffin-embedded bone marrow biopsies is useful for the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Virchows Archiv* 454: 411-419.
  40. Valent, P., Akin, C., Escribano, L., Födinger, M., Hartmann, K., Brockow, K., Castells, M., Sperr, W.R., Kluin-Nelemans, H.C., Hamdy, N.A.T., Lortholary, O., Robyn, J., Van Doormaal, J., Sotlar, K., Hauswirth, A.W., Arock, M., Hermine, O., Hellmann, A., Triggiani, M., Niedoszytko, M., Schwartz, L.B., Orfao, A., Horny, H.P. & Metcalfe, D.D. (2007) Standards and standardization in mastocytosis: Consensus Statements on Diagnostics, Treatment Recommendations and Response Criteria. *European Journal of Clinical Investigation* 37: 435-453.
  41. Such, E., Cervera, J., Costa, D., Sole, F., Vallespi, T., Luno, E., Collado, R., Calasanz, M.J., Hernandez-Rivas, J.M., Cigudosa, J.C., Nomdedeu, B., Mallo, M., Carbonell, F., Bueno, J., Ardanaz, M.T., Ramos, F., Tormo, M., Sancho-Tello, R., del Canizo, C., Gomez, V., Marco, V., Xicoy, B., Bonanad, S., Pedro, C., Bernal, T. & Sanz, G.F. (2011) Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 96: 375-383.
  42. Chesnais, V., Kosmider, O., Damm, F., Itzykson, R., Bernard, O.A., Solary, E. & Fontenay, M. (2012) Spliceosome mutations in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget* 3: 1284-1293.
  43. Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M.,

- Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., Nolte, F., Hofmann, W.-K., Miyawaki, S., Sugano, S., Haferlach, C., Koeffler, H.P., Shih, L.-Y., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S. & Ogawa, S. (2011) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478: 64-69.
44. Levine, R.L., Loriaux, M., Huntly, B.J., Loh, M.L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J.J., Willis, S.G., Nguyen, K.T., Flores, N.J., Estey, E., Gattermann, N., Armstrong, S., Look, A.T., Griffin, J.D., Bernard, O.A., Heinrich, M.C., Gilliland, D.G., Druker, B. & Deininger, M.W. (2005) The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106: 3377-3379.
  45. Shepard, P.J. & Hertel, K.J. (2009) The SR protein family. *Genome biology* 10: 242.
  46. Löffler, G., Petrides, P.E. & Heinrich, P.C. (2007) *Biochemie und Pathobiochemie* (8. Auflage), 262-267 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2007).
  47. Chen, W. & Moore, M.J. (2014) The spliceosome: disorder and dynamics defined. *Current Opinion in Structural Biology* 24: 141-149.
  48. Long, J.C. & Caceres, J.F. (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical journal* 417: 15-27.
  49. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. (2006) *Duale Reihe Biochemie*, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006).
  50. Meggendorfer, M., Roller, A., Haferlach, T., Eder, C., Dicker, F., Grossmann, V., Kohlmann, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Ogawa, S., Koeffler, H.P., Kern, W., Haferlach, C. & Schnittger, S. (2012) SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* 120: 3080-3088.
  51. Patnaik, M.M., Lasho, T.L., Finke, C.M., Hanson, C.A., Hodnefield, J.M., Knudson, R.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2013) Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: Prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *American Journal of Hematology* 88: 201-206.
  52. Makishima, H., Visconte, V., Sakaguchi, H., Jankowska, A.M., Abu Kar, S., Jerez, A., Przychodzen, B., Bupathi, M., Guinta, K., Afable, M.G., Sekeres, M.A., Padgett, R.A., Tiu, R.V. & Maciejewski, J.P. (2012) Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 119: 3203-3210.
  53. Thol, F., Kade, S., Schlarman, C., Loffeld, P., Morgan, M., Krauter, J., Wlodarski, M.W., Kolking, B., Wichmann, M., Gorlich, K., Gohring, G., Bug, G., Ottmann, O., Niemeyer, C.M., Hofmann, W.K., Schlegelberger, B., Ganser, A. & Heuser, M. (2012) Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 119: 3578-3584.

54. Wu, S.-J., Kuo, Y.-Y., Hou, H.-A., Li, L.-Y., Tseng, M.-H., Huang, C.-F., Lee, F.-Y., Liu, M.-C., Liu, C.-W., Lin, C.-T., Chen, C.-Y., Chou, W.-C., Yao, M., Huang, S.-Y., Ko, B.-S., Tang, J.-L., Tsay, W. & Tien, H.-F. (2012) The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood* 120: 3106-3111.
55. Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Pardanani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., Ketterling, R.P., Rotunno, G., Knudson, R.A., Susini, M.C., Laborde, R.R., Spolverini, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Manfredini, R., Tagliafico, E., Zini, R., Jones, A., Zoi, K., Reiter, A., Duncombe, A., Pietra, D., Rumi, E., Cervantes, F., Barosi, G., Cazzola, M., Cross, N.C.P. & Tefferi, A. (2013) Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 27: 1861-1869.
56. Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Morabito, M., Preudhomme, C., Berthon, C., Ades, L., Fenaux, P., Platzbecker, U., Gagey, O., Rameau, P., Meurice, G., Orear, C., Delhommeau, F., Bernard, O.A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Droin, N. & Solary, E. (2013) Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 121: 2186-2198.
57. Quintanilla-Martinez, L., Tinguely, M., Bonzheim, I. & Fend, F. (2012) [Bone marrow biopsy: processing and use of molecular techniques]. *Der Pathologe* 33: 481-489.
58. Fend, F., Bock, O., Kremer, M., Specht, K. & Quintanilla-Martinez, L. (2005) Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 447: 909-919.
59. Bonin, S., Hlubek, F., Benhattar, J., Denkert, C., Dietel, M., Fernandez, P.L., Hofler, G., Kothmaier, H., Kruslin, B., Mazzanti, C.M., Perren, A., Popper, H., Scarpa, A., Soares, P., Stanta, G. & Groenen, P.J. (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 457: 309-317.
60. van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A.S., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H.J.M., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M. & Macintyre, E.A. (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257-2317.
61. Sotlar, K., Bache, A., Stellmacher, F., Bultmann, B., Valent, P. & Horny, H.P. (2008) Systemic mastocytosis associated with chronic idiopathic myelofibrosis: a distinct subtype of systemic mastocytosis associated with a [corrected] clonal hematological non-mast [corrected] cell lineage

- disorder carrying the activating point mutations KITD816V and JAK2V617F. *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 10: 58-66.
62. Murugesan, G., Aboudola, S., Szpurka, H., Verbic, M.A., Maciejewski, J.P., Tubbs, R.R. & Hsi, E.D. (2006) Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *American journal of clinical pathology* 125: 625-633.
  63. Olsen, R.J., Tang, Z., Farkas, D.H., Bernard, D.W., Zu, Y. & Chang, C.-C. (2006) Detection of the JAK2V617F Mutation in Myeloproliferative Disorders by Melting Curve Analysis Using the LightCycler System. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 997-1003.
  64. Ho, C.-L., Wu, Y.-Y., Hung, H.-M., Chang, P.-Y., Kao, W.-Y., Chen, Y.-C. & Chao, T.-Y. (2012) Rapid identification of heterozygous or homozygous JAK2V617F mutations in myeloproliferative neoplasms using melting curve analysis. *Journal of the Formosan Medical Association* 111: 34-40.
  65. Warshawsky, I. & Mularo, F. (2011) Locked nucleic acid probes for enhanced detection of FLT3 D835/I836, JAK2 V617F and NPM1 mutations. *Journal of clinical pathology* 64: 905-910.
  66. Horny, H.P., Metcalfe, D.D., Bennett, J.M., Bain, B.J., Akin, C., Escribano, L. & Valent, P. (2008) Mastocytosis. 54-63. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:54-63.*
  67. Horn, T., Kremer, M., Dechow, T., Pfeifer, W.M., Geist, B., Perker, M., Duyster, J., Quintanilla-Martinez, L. & Fend, F. (2006) Detection of the activating JAK2 V617F mutation in paraffin-embedded trephine bone marrow biopsies of patients with chronic myeloproliferative diseases. *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 8: 299-304.
  68. Srinivasan, M., Sedmak, D. & Jewell, S. (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161: 1961-1971.
  69. Kar, S.A., Jankowska, A., Makishima, H., Visconte, V., Jerez, A., Sugimoto, Y., Muramatsu, H., Traina, F., Afable, M., Guinta, K., Tiu, R.V., Przychodzen, B., Sakaguchi, H., Kojima, S., Sekeres, M.A., List, A.F., McDevitt, M.A. & Maciejewski, J.P. (2013) Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 98: 107-113.
  70. Tefferi, A. & Barbui, T. (2015) Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology* 90: 162-173.
  71. Lasho, T.L., Jimma, T., Finke, C.M., Patnaik, M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2012) SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* 120: 4168-4171.

72. Brecqueville, M., Rey, J., Devillier, R., Guille, A., Gillet, R., Adélaide, J., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Chaffanet, M., Mozziconacci, M.-J., Vey, N., Birnbaum, D. & Murati, A. (2014) Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica* 99: 37-45.
73. Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H.P., Klein, H.U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, A., Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W. & Ogawa, S. (2014) Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28: 241-247.
74. Je, E.M., Yoo, N.J., Kim, Y.J., Kim, M.S. & Lee, S.H. (2013) Mutational analysis of splicing machinery genes SF3B1, U2AF1 and SRSF2 in myelodysplasia and other common tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133: 260-265.
75. Sun, C., Zhang, S., Qiao, C., Yang, X. & Li, J. (2014) Clinical manifestation of the SRSF2 gene mutation in Chinese patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Chinese medical journal* 127: 4215-4219.
76. Wassie, E.A., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Solary, E., Tefferi, A. & Patnaik, M.M. (2014) Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am J Hematol* 89: 1111-1115.
77. Patnaik, M.M., Wassie, E.A., Padron, E., Onida, F., Itzykson, R., Lasho, T.L., Kosmider, O., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Komrokji, R., Tefferi, A. & Solary, E. (2015) Chronic myelomonocytic leukemia in younger patients: molecular and cytogenetic predictors of survival and treatment outcome. *Blood cancer journal* 5: e280.
78. Zhang, S.-J., Rampal, R., Manshour, T., Patel, J., Mensah, N., Kayserian, A., Hricik, T., Heguy, A., Hedvat, C., Gönen, M., Kantarjian, H., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. & Verstovsek, S. (2012) Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood* 119: 4480-4485.
79. Daubner, G.M., Cléry, A., Jayne, S., Stevenin, J. & Allain, F.H.T. (2012) A syn-anti conformational difference allows SRSF2 to recognize guanines and cytosines equally well. *The EMBO Journal* 31: 162-174.
80. Xiao, R., Sun, Y., Ding, J.H., Lin, S., Rose, D.W., Rosenfeld, M.G., Fu, X.D. & Li, X. (2007) Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol* 27: 5393-5402.
81. Zhong, X.Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M.G. & Fu, X.D. (2009) SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Molecular cell* 35: 1-10.

82. Padron, E. & Steensma, D.P. (2015) Cutting the cord from myelodysplastic syndromes: chronic myelomonocytic leukemia-specific biology and management strategies. *Current opinion in hematology* 22: 163-170.
83. Lehmann, U., Bartels, S., Hasemeier, B., Geffers, R., Schlue, J., Büsche, G., Hussein, K. & Kreipe, H. (2013) SRSF2 mutation is present in the hypercellular and prefibrotic stage of primary myelofibrosis. *Blood* 121: 4011-4012.
84. Bain, B.J., Brunning, R., D., Vardiman, J.W. & Thiele, J. (2008) Chronic neutrophilic leukaemia. 38-39. in *Swerdlow SH, Campo E, Jaffe ES, et al ed. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France: IARC Press; 2008:38-39.*
85. Tefferi, A., Elliott, M. & Pardanani, A. (2015) Chronic neutrophilic leukemia: novel mutations and their impact on clinical practice. *Current opinion in hematology* 22: 171-176.
86. Meggendorfer, M., Haferlach, T., Alpermann, T., Jeromin, S., Haferlach, C., Kern, W. & Schnittger, S. (2014) Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 99: e244-246.
87. Lin, J., Yang, J., Wen, X.M., Yang, L., Deng, Z.Q., Qian, Z., Ma, J.C., Guo, H., Zhang, Y.Y., Qian, W. & Qian, J. (2014) Detection of SRSF2-P95 Mutation by High-Resolution Melting Curve Analysis and Its Effect on Prognosis in Myelodysplastic Syndrome. *PloS one* 9: e115693.
88. Garza, E., Fabiani, E., Noguera, N., Panetta, P., Piredda, M.L., Borgia, L., Maurillo, L., Catalano, G., Voso, M.T. & Lo-Coco, F. (2015) Development of a high-resolution melting curve analysis screening test for SRSF2 splicing factor gene mutations in myelodysplastic syndromes. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 17: 85-89.
89. Schnittger, S., Bacher, U., Eder, C., Dicker, F., Alpermann, T., Grossmann, V., Kohlmann, A., Kern, W., Haferlach, C. & Haferlach, T. (2012) Molecular analyses of 15,542 patients with suspected BCR-ABL1-negative myeloproliferative disorders allow to develop a stepwise diagnostic workflow. *Haematologica* 97: 1582-1585.
90. Steensma, D.P., Dewald, G.W., Lasho, T.L., Powell, H.L., McClure, R.F., Levine, R.L., Gilliland, D.G. & Tefferi, A. (2005) The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 106: 1207-1209.
91. Pich, A., Riera, L., Sismondi, F., Godio, L., Bonino, L.D., Marmont, F. & di Celle, P.F. (2009) JAK2V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia. *Journal of clinical pathology* 62: 798-801.
92. Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M. & Issa, J.P. (2005)

- JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 106: 3370-3373.
93. Pellagatti, A. & Boulwood, J. (2015) The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology* 96: 3-15.
  94. Horny, H.P., Sotlar, K., Sperr, W.R. & Valent, P. (2004) Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *Journal of clinical pathology* 57: 604-608.
  95. Lim, K.-H., Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Patnaik, M., Butterfield, J.H., McClure, R.F., Li, C.-Y. & Pardanani, A. (2009) Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 113: 5727-5736.
  96. Sotlar, K., Colak, S., Bache, A., Berezowska, S., Krokowski, M., Bültmann, B., Valent, P. & Horny, H.-P. (2010) Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM–AHNMD). *The Journal of Pathology* 220: 586-595.
  97. Sotlar, K., Fridrich, C., Mall, A., Jaussi, R., Bültmann, B., Valent, P. & Horny, H.-P. (2002) Detection of c-kit point mutation Asp-816 → Val in microdissected pooled single mast cells and leukemic cells in a patient with systemic mastocytosis and concomitant chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia research* 26: 979-984.
  98. Jawhar, M., Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Horny, H.P., Metzgeroth, G., Muller, N., Schneider, S., Naumann, N., Walz, C., Haferlach, T., Valent, P., Hofmann, W.K., Cross, N.C.P., Fabarius, A. & Reiter, A. (2015) Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia* 29: 1115-1122.
  99. Hanssens, K., Brenet, F., Agopian, J., Georgin-Lavialle, S., Damaj, G., Cabaret, L., Chandesris, M.O., de Sepulveda, P., Hermine, O., Dubreuil, P. & Soucie, E. (2014) SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica* 99: 830-835.
  100. Schwaab, J., Schnittger, S., Sotlar, K., Walz, C., Fabarius, A., Pfirrmann, M., Kohlmann, A., Grossmann, V., Meggendorfer, M., Horny, H.-P., Valent, P., Jawhar, M., Teichmann, M., Metzgeroth, G., Erben, P., Ernst, T., Hochhaus, A., Haferlach, T., Hofmann, W.-K., Cross, N.C.P. & Reiter, A. (2013) Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood* 122: 2460-2466.

## 7. Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen unter der Betreuung von Professor Dr. Falko Fend durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Dr. Falko Fend in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Irina Bonzheim, Frau Dr. Birgit Federmann und mir.

Die Aushebung der Fälle aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie erfolgte durch mich nach Anleitung durch Frau Marit Osigus.

Die Sanger-Sequenzierung und die RFLP-Analyse zur *SRSF2*-Mutationsanalyse wurden durch Frau Dr. Irina Bonzheim und Professor Dr. Falko Fend in Zusammenarbeit mit mir konzipiert und gemeinsam etabliert.

Die Versuche zur *SRSF2*-Mutationsanalyse wurden durch mich nach Einarbeitung durch Frau Dr. Irina Bonzheim und mit Unterstützung von Frau Sabine Schäfer, Frau Sema Colak, Frau Dr. Julia Steihilber und Frau Janine Schmidt eigenständig durchgeführt. Daraus entstanden die zum Teil auch in der Publikation verwendeten folgenden Abbildungen: Abbildung 16, Abbildung 18, Abbildung 20 und Abbildung 21.

Die Versuchsergebnisse wurden durch mich unter Anleitung und Unterstützung von Frau Dr. Irina Bonzheim ausgewertet und interpretiert.

Die histologische und klinische Klassifikation erfolgte durch Professor Dr. Falko Fend gemeinsam mit Frau Dr. Birgit Federmann und mir. Unterstützend tätig waren Frau Professor Dr. Leticia Quintanilla de Fend, Leonardo Boiocchi und Professor Attilio Orazi. Die in dieser Dissertationsschrift und der Publikation verwendeten histologischen Abbildungen (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15) wurden durch Frau Dr. Birgit Federmann, Herrn Professor Falko Fend und mich ausgewählt und erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Birgit Federmann. Daraus entstanden die in Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9 und Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse, welche auch teilweise für die Publikation verwendet wurden.

Die *JAK2*-Mutationsanalysen sowie *KIT*-Mutationsanalysen wurden durch Dr. David Rosero nach Einarbeitung durch Frau Dr. Irina Bonzheim in Zusammenarbeit mit Frau Sema Colak durchgeführt. Die Auswertung erfolgte von Frau Dr. Irina Bonzheim. Daraus entstanden die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse und Teile der in Tabelle 10 dargestellten Daten.

Die Publikation wurde durch Frau Dr. Birgit Federmann und mich im Rahmen einer Ko-Erstautorenschaft verfasst, Frau Dr. Irina Bonzheim und Herr Professor Dr. Falko Fend wirkten als Ko-Letzt Autoren. Professor Dr. Wichard Vogel und Professor Dr. Lothar Kanz waren an der Erfassung der klinischen Daten beteiligt. Frau Professor Dr. Leticia Quintanilla de Fend, Leonardo Boiocchi und Professor Attilio Orazi waren an der histologischen Klassifikation beteiligt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Frau Dr. Irina Bonzheim und Frau Dr. Birgit Federmann verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Fellbach, den

---

Manuel Sebastian Abele

## 8. Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Federmann, B., Abele, M., Rosero Cuesta, D.S., Vogel, W., Boiocchi, L., Kanz, L., Quintanilla-Martinez, L., Orazi, A., Bonzheim, I. & Fend, F. The detection of *SRSF2* mutations in routinely processed bone marrow biopsies is useful in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia. *Human pathology* (2014) 45: 2471–2479

## 9. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Falko Fend. Er hat diese Studie konzipiert und mich von Beginn bis Ende meiner Arbeit hervorragend betreut. Seine Tür stand zu jeder Zeit offen, er nahm sich immer Zeit, den aktuellen Stand der Ergebnisse und das weitere Vorgehen zu besprechen. Zudem machte er sich auch die Mühe, mir die komplexe Hämatopathologie zu erklären und mit mir gemeinsam die Histopathologie direkt am Mikroskop zu besprechen. Durch diese exzellente Betreuung war das Thema und die Fragestellung für mich jederzeit transparent und die Arbeit in der experimentellen Forschung dadurch spannend und sehr lehrreich.

An nächster Stelle möchte ich Frau Dr. Irina Bonzheim danken. Sie hat mich ebenfalls während der meiner gesamten Zeit im Institut betreut. Sie entwickelte die molekularpathologischen Untersuchungen, führte mich in die Laborarbeit ein, nahm sich immer Zeit für Fragen oder falls Hilfe benötigt wurde, besprach mit mir ausführlich alle Ergebnisse und half mir bei der Interpretation und Dokumentation. Des weiteren war sie eine sehr große Hilfe beim Erstellen der Veröffentlichung und dieser Dissertation. Es ist auch nicht hoch genug einzuschätzen, wie toll sie stets für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgte.

Ganz herzlich möchte ich auch Frau Dr. Birgit Federmann danken. Sie half mir mit ihrer Erfahrung bei der Erhebung der klinischen Daten und insbesondere bei der statistischen Auswertung. Mit ihr gemeinsam verfasste ich das Manuskript für die Publikation und durch Ihre Hilfe und ihren Einsatz konnte es

letztendlich auch veröffentlicht werden. Und nicht zuletzt möchte ich mich bei ihr selbstverständlich auch für die großartige Betreuung beim Verfassen dieser Dissertation bedanken.

Als weitere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe möchte ich Frau Dr. Julia Steinhilber und Frau Janine Schmidt ganz herzlich danken. Ich bin immer sehr gerne in das Institut gekommen, die Atmosphäre war sehr nett und die beiden hatten immer hilfreiche Tipps oder aufmunternde Worte parat, auch wenn einmal Ergebnisse nicht zufriedenstellend waren.

Großen Dank gilt auch Frau Sabine Schäfer und Frau Sema Colak, die mir bei den Laborarbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. David Rosero, der einige Monate im Institut verbrachte, führte größtenteils die *JAK2*- und *KIT*-Mutationsanalysen durch. Die Ergebnisse halfen zum einen bei der Klassifikation der Fälle, zum anderen sind sie eine tolle Ergänzung zur Auswertung und Interpretation der *SRSF2*-Mutationen. Dafür gilt ihm mein herzlicher Dank.

Hinzu kommen noch zahlreiche weitere Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, die ich hier nicht alle namentlich erwähnen kann, ohne die es mir aber nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit in dieser Form durchzuführen, vielen Dank dafür.

An letzter Stelle gilt mein Dank auch meinem gesamten Umfeld, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium und diese Doktorarbeit ermöglichten und mich jederzeit dabei unterstützten. Ebenso danke ich meiner Freundin, die mich all die Zeit begleitet hat, meinen Freunden und meinen Studienkollegen.