

Aus der Klinik für
Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Prof. Dr. med. Rainer Haas

Myelodysplastische Syndrome
vom Labor in die Klinik:
Molekulare Analyse von JAK2, MPL und Mortalin
sowie klinische Daten zur Komorbidität

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Esther Zipperer
2011

Als Inauguraldisseration gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent: Prof. Dr. med. Nobert Gattermann
Koreferent: Prof. Dr. med. Matthias Schott

ABKÜRZUNGEN	VI
I EINLEITUNG.....	1
1.1 Myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome	1
1.1.1 Myelodysplastische Syndrome	1
1.1.1.1 Myelodysplastische Syndrome mit Thrombozytose	7
1.1.1.2 MDS mit isolierter Deletion (5q).....	8
1.1.2 Die myeloproliferativen Syndrome	9
1.2 Targets der Mutationsanalysen bei MDS-Patienten.....	10
1.2.1 Der JAK/STAT Signaltransduktionsweg	10
1.2.1.1 JAK2	10
1.2.1.2 JAK2 V617F	10
1.2.2 Der TPO-Rezeptor MPL.....	12
1.2.2.1 MPL W515 L/K.....	12
1.3 Alterungsmechanismen.....	13
1.3.1 Genomische Instabilität.....	13
1.3.2 Telomerverkürzung	13
1.3.3 Die mitochondriale Alterungstheorie	14
1.4. Mortalin.....	14
1.4.1 Mortalin und MDS	15
1.4.2 Mortalin und Alterung	16
1.5 Komorbidität bei MDS-Patienten	16
1.5.1 Werkzeuge zur Erfassung von Komorbidität.....	17
1.5.1.1 Der Charlson-Komorbiditäts-Index	17
1.5.1.2 Der Komorbiditäts-Index für Patienten mit hämatopoietischer SCT.....	18
1.6 Zielsetzung.....	19
II MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer.....	20
2.1.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	22
2.1.3 Primäre Zellen	23
2.1.4 Patienten	23
2.1.4.1 Knochenmark.....	23
2.1.4.2 Vollblut	28
2.1.4.3 Apheresat.....	28
2.1.5 Antikörper und Farbstoffe.....	28
2.1.5.1 Konjugierte Antikörper	29
2.1.5.2 Nicht konjugierte Primärantikörper	29
2.1.5.3 Sekundärantikörper	29
2.1.5.4 Farbstoffe.....	29
2.1.6 MACS-Technologie	30
2.1.6.1 Magnetpartikel (<i>MicroBeads</i>).....	30
2.1.6.2 Magnetischer Zell-Separator	30
2.1.6.3 Separationssäulen	30
2.1.7 Oligonukleotide	31
2.1.8 Geräte und Plastikmaterial.....	31

2.2 Methoden	32
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	32
2.2.1.1 DNA-Isolierung	32
2.2.1.2 DNA-Einengung	32
2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.2.3 Synthese von cDNA	33
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).....	33
2.2.4.1 Amplifikation durch konventionelle PCR.....	34
2.2.4.2 Amplifikation durch <i>real-time</i> PCR und Schmelzkurvenanalyse	34
2.2.4.2.1 JAK2 V617F	34
2.2.4.2.2 MPL W515L.....	35
2.2.5 Gel-Elektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte	35
2.2.5.1 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	36
2.2.6 DNA-Sequenzierung	36
2.2.7 Zellkultur.....	36
2.2.7.1 Separierung mononukleärer Zellen mittels Dichtezentrifugation.....	36
2.2.7.2 Anreicherung von CD34 ⁺ -Zellen	37
2.2.7.3 Zellzahlbestimmung.....	38
2.2.7.4 Kultivierungsbedingungen	38
2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen	38
2.2.9 Lebendfärbungen	40
2.2.9.1 Lebendfärbung mit dem Mitotracker.....	40
2.2.10 Immunhistochemische Analysen	40
2.2.10.1 Färbungen in Suspension.....	40
2.2.10.2 Färbungen auf Adhäsionsobjektträgern	40
2.2.10.3 Extrazelluläre Färbungen.....	41
2.2.10.3.1 Färbung mit einem unkonjugierten Primärantikörper.....	41
2.2.10.3.2 Doppelfärbung mit zwei Primärantikörpern aus einer Spezies	42
2.2.10.4 Intrazelluläre Färbung.....	42
2.3.1 Analyse von Komorbiditäten	43
2.3.1.1 Patienten.....	43
2.3.1.2 Datenanalyse.....	43
2.3.1.3 Nicht-leukämische Todesursache	43
 III ERGEBNISSE	 44
 3.1 Mutationsanalysen	 44
3.1.1 DNA-Isolierung, konventionelle PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung von JAK2 V617F	44
3.1.2 Etablierung der <i>real-time</i> PCR und der Schmelzkurvenanalyse für JAK2 V617F	46
3.1.3 Ergebnisse Mutationsanalyse JAK2 V617F.....	48
3.1.4 MPL W515L/K <i>real-time</i> PCR und Schmelzkurvenanalyse	49
3.1.5 Statistische Analysen	50
 3.2 Analyse der intrazellulären Distribution von Mortalin	 51
3.2.1 Zellzahlen und Aufreinigung von MDS-Knochenmark	51
3.2.3 Zeitreihen im Durchflusszytometer	52
3.2.4 Quantitative Analyse von Mortalin im Durchflusszytometer.....	52
3.2.5 Mikroskopie	54
3.2.5.1 Polarität von CD34 ⁺ -Zellen aus MDS-Knochenmark.....	54
3.2.5.2. Polarität von CD34 ⁺ -Zellen aus Apheresat.....	55
3.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen.....	55
3.2.6.1 Mortalin als Mitochondrien-Marker	55
3.2.6.2 Verteilungsmuster von Mortalin bei CD34 ⁺ -Zellen aus MDS-Knochenmark	56
3.2.6.3 Verteilungsmuster von Mortalin in CD34 ⁺ -Zellen aus Apheresat	57
3.2.6.4 Verteilungsmuster von Mortalin bei CD34 ⁺ -Zellen aus Knochenmark von hämatologisch gesunden älteren Probanden	59
3.2.3 Verteilungsmuster von Mortalin während der Mitose.....	59

3.3 Analyse von Komorbiditäten bei MDS-Patienten	63
3.3.1 Analyse von Komorbiditäten anhand des CCI	63
3.3.2 Analyse von Komorbiditäten anhand des HCTCI	65
3.3.3 Multivariate Analyse der Komorbiditäts-Indices	67
3.3.4 Nicht-leukämische Todesursachen.....	67
IV DISKUSSION	68
4.1 Mutationsanalysen	68
4.1.1 RARS-T.....	68
4.1.2 JAK2 V617F bei MDS mit isolierter Deletion (5q).....	73
4.1.3 JAK2 V617F bei MDS (allgemein) mit Thrombozytose	73
4.2 Mortalin	74
4.2.1 Mortalin Verteilung in CD34 ⁺ -Zellen.....	74
4.2.2 Mortalin-Verteilung in CD34 ⁺ -Zellen während der Mitose.....	76
4.3 Analyse von Komorbiditäten bei Patienten mit MDS	78
V ZUSAMMENFASSUNG	82
VI SUMMARY	83
VII LITERATURVERZEICHNIS	84
PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGEFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
DANKSAGUNG	95

Abkürzungen

In der deutschen Sprache gebräuchliche Abkürzungen, physikalische Einheiten und von der IUPAC festgelegte Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt.

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
AML	akute myeloische Leukämie
AK	Antikörper
ATM	ataxia telangiectasia mutated
bp	Basenpaar
BFU-E	burst forming unit erythrocytes
BSA	bovines Serumalbumin
BSC	Best-Supportive-Care
CCI	Charlson comorbidity index
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CDR	critical deleted region
CEL	chronische Eosinophilen-Leukämie
CIS	cytokine inducible SH2 containing protein
CMML	chronische myelomonozytäre Leukämie
CMXRos	Derivat von X-Rosamin
CNL	chronische Neutrophilen-Leukämie
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAPCO	(1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan)
DAPI	4',6-Diamino-2-phenyllindol Dihydrochlorid
Del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleinsäuretriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEC	endogenous erythroid colonie
EPO	Erythropoietin
ERK	extracellular signal related kinase

ET	essentielle Thrombozythämie
F	Phenylalanin
Fab	Fragment antigenbindend
Fc	Fragment kristallin
FAB	French-American-British (Cooperative Study Group)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Iso-Thiocyanat
Flt3-L	fetal-liver tyrosine kinase 3 Ligand
FSC	Forward Scatter
GB	Great Britain
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
Grb 2	growth factor receptor binding protein 2
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HCTCI	hematopoietic cell transplantation comorbidity index
HPLC	high pressure liquid chromatography
HPSF	high purity salt free
HSP	Hitzeschockprotein
HSZ	hämatopoietische Stammzelle
HSPZ	hämatopoietische Stamm- und Progenitorzelle
ICUS	Idiopathische Zytopenie unklarer Signifikanz
Ig	Immunglobuline
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
IMF	idiopathische Myelofibrose
IPSS	international prognostic scoring system
IUPAC	international union of pure and applied chemistry
JAK	Janus Kinase
K	Lysin
KM	Knochenmark
L	Leucin
MACS	magnetic activated cell sorting
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MF	Myelofibrose

MNZ	mononukleäre Zellen
MPL	myeloproliferatives Leukämie (-Virus-Onkogen)
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MPO	Myeloperoxidase
MPS	myeloproliferatives Syndrom
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
P	Phosphat
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIAS	protein inhibitors of activated STAT
PI3K	Proteinkinase 3
PV	Polyzythämia vera
RA	refraktäre Anämie
RAEB	refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung (excess of blasts)
RAEB-T	RAEB in Transformation zur AML
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie
RCUD	refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
RSCMD	refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie und Ringsideroblasten
RN	refraktäre Neutropenie
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	refraktäre Thrombozytopenie
SCF	stem cell factor
SCT	Stammzelltransplantation
SH2	Src homology domain 2
Shp	Src homology phosphatase

SOCS	supressor of cytokine signalling
SSC	Side Scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
TIM	Translokase der inneren Membran
TBE	TrisHCl/Borat/EDTA-Puffer
TET	ten-eleven translocation
TOM	Translokase der äußeren Membran
TPO	Thrombopoietin
TYK2	Tyrosinkinase 2
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
V	Valin
W	Tryptophan
WHO	World Health Organization
WPSS	WHO adapted prognostic scoring system
XCIP	X chromosome inactivation pattern
Y	Tyrosin

I Einleitung

1.1 Myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome

Die Klassifikation der klonalen Erkrankungen der myeloischen Zellreihen des Knochenmarks unterscheidet seit Jahrzehnten zwei große Gruppen neben den akuten myeloischen Leukämien: die myelodysplastischen Syndrome und die chronischen myeloproliferativen Syndrome.

1.1.1 Myelodysplastische Syndrome

Die myelodysplastischen Syndrome (MDS) sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch abnorme Proliferation und Reifungsstörungen einer myeloischen hämatopoietischen Stammzelle im Knochenmark gekennzeichnet sind und aufgrund derer Zytopenien im peripheren Blut bestehen (Jaffe und Harris 2001). Myelodysplastische Syndrome sind stark altersgebunden, das mediane Alter beträgt 70 Jahre. Weiterhin gibt es ein leichtes Überwiegen des männlichen Geschlechts (Greenberg *et al.*, 1997, Germing 2002). 70% der MDS-Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Anämiesymptome wie Müdigkeit oder Ohrensausen etc., 30% klagen über Infektionen und bei 20% können Zeichen einer hämorrhagischen Diathese gefunden werden (Germing 2002). Tabelle 1.1 zeigt zytomorphologische Befunde im MDS-Knochenmark (nach Germing 2002)

Tabelle 1.1: Zytomorphologische Befunde im MDS-Knochenmark (nach Germing 2002)

Zytomorphologische Befunde					
Erythropoiese	MDS-KM in %	Granulomonocytopoiese	MDS-KM in %	Megakaryopoiese	MDS-KM in %
Hyperplasie der Erythropoiese	48	Medullärer Blastenanteil*	6 (0-29)	Reifungsstörung	70
Erythroblastenanteil*	30 (1-92)	Linksverschiebung	84	Hypersegmentierte Zellen	27
Megaloblastäre Zellen	41	erhöhter Promyelozytenanteil	80	Abgerundete Kernsegmente	31
Mehrkernigkeit	19	Auer-Stäbchen	6	Mikromegakaryozyten	32
Kernabsprengungen	44	hypogranulierte Myelozyten	49	Mononukleäre Megakaryozyten	40
Kernfaltungen	41	Kernatypien	32	Dysplastische Megakaryozyten	48
Kernbrückenbildung	10	hypersegmentierte Zellen	26	Zellularität	
Atypische Mitosen	13	Pseudo-Pelger-Zellen	46	hypozellulär	23
Zytoplasmatische Dysplasie	16	Hyperplasie der Granulopoiese	60	normozellulär	55
Sideroblastose	63	partieller MPO-Defekt	27	hyperzellulär	22
Reifungsstörungen	94				
PAS-Positivität	26				
Ringsideroblasten*	3 (0-97)				
Dyserythropoiese	100	Dysgranulopoiese	86	Dysmegakaryopoiese	87

* Angaben in Prozent, Median und Spanne

Die Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome befindet sich seit mehreren Jahren aufgrund verbesserter Einblicke in Zytogenetik und Morphologie der Erkrankungen im Umbruch. Tabelle 1.2 zeigt die zytomorphologische Klassifikation der MDS-Subtypen der French-American-British (FAB) Cooperative Group aus dem Jahre 1982 (Bennett *et al.*, 1982).

Tabelle 1.2 FAB-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome nach Bennett *et al.* 1982

FAB-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome				
Subtyp	Blastenanteil		andere Kriterien	
	Blut	KM	Blut	KM
RA	≤1%	<5%		<15% Ringsideroblasten
RARS	≤1%	<5%		≥15% Ringsideroblasten
RAEB	<5%	10-19%		keine Auerstäbchen
RAEB-T	<20%	20-29%		Auerstäbchen möglich
CMML	<5%	<20%	Monozytose >1000/μl	

Tabelle 1.3 zeigt die überarbeitete Version der World-Health-Organisation (WHO) aus dem Jahr 2008 (Brunnig *et al.*, in Swerdlow *et al.*, 2008). Die wichtigsten Neuerungen der WHO-Klassifikation bestanden 2001 in der Einführung neuer Kategorien wie z.B. des MDS mit isolierter Deletion (5q), der Unterscheidung von uni- und multilineären Dysplasien sowie der Unterteilung der Gruppe RAEB in zwei Untergruppen anhand des peripheren und medullären Blastenanteils (Bennett, 2005). Diese Neuerungen wurden 2008 weitgehend übernommen. Zusätzlich wurde die neue Kategorie der refraktären Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) eingeführt, die 3 Untergruppen, nämlich refraktäre Anämie, refraktäre Thrombozytopenie (RT) sowie refraktäre Neutropenie (RN) umfasst (Vardiman *et al.*, 2009).

Tabelle 1.3: WHO-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome 2008

WHO-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome 2008				
Subtyp	Blastenanteil		andere Kriterien	
	Blut	KM	Blut	KM
RCUD (RA, RN, RT)	<1%	<5%	Uni- oder Bizytopenie	unilineäre Dysplasie ≥10% der Zellen einer Reihe sind betroffen <15% Ringsideroblasten
RARS	keine	<5%	Anämie	nur erythroide Dysplasie ≥15% Ringsideroblasten
RCMD	<1%	<5%	Bizytopenie oder Panzytopenie keine Auer Stäbchen <1x10 ⁹ /l Monozyten	Dysplasie in ≥ 10% der Zellen in min. 2 myeloiden Zelllinien ± 15% Ringsideroblasten keine Auer Stäbchen
RAEB-1	<5%	5-9%	Zytopenien keine Auer Stäbchen <1x10 ⁹ /l Monozyten	uni- oder multilineäre Dysplasie keine Auer Stäbchen
RAEB-2	5%-19%	10-19%	Zytopenien Auer-Stäbchen möglich <1x10 ⁹ /l Monozyten	uni- oder multilineäre Dysplasie Auer Stäbchen möglich
MDS-U	≤1%	<5%	Zytopenien keine Auer Stäbchen	Dysplasie in ≤ 10% einer oder mehreren myeloiden Zelllinien, wenn die Zyto- genetik für ein MDS spricht
MDS mit 5q-	<1%	<5%	Anämie normale o. er- höhte Thrombozytenzahl	normale oder vermehrte Megakaryozyten mit hypobulierten Kernen isolierte 5q- Aberration keine Auer Stäbchen

Zur Prognoseabschätzung von MDS-Patienten wurden im Laufe der Jahre mehrere Scores entwickelt (Sanz *et al.*, 1989; Aul *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1997; Malcovati *et al.*, 2007). Der Goldstandard ist das *International Prognostic Scoring System* (IPSS), das 1997 entwickelt wurde. Es berücksichtigt 3 Faktoren (Tab 1.4), auf deren Basis eine Unterteilung in 4 Risikogruppen erfolgt:

- Niedrigrisikogruppe: 0 Punkte
- Intermediär-1 Risikogruppe: 0,5-1 Punkt
- Intermediär-2 Risikogruppe 1,5-2 Punkte
- Hochrisikogruppe >2 Punkte.

Tabelle 1.4 Variablen und Gewichtung des IPSS

Variable	Gewichtung				
	0	0,5	1	1,5	2
KM Blasten in %	<5	5-10		11-20	21-30
Karyotyp	<i>good risk</i>	<i>intermediate risk</i>	<i>poor risk</i>		
Zytopenien	0-1	2-3			

Definitionen der Karyotyp-Risiken siehe unten

Ein weiterer wichtiger Score ist das von Malcovati und Kollegen entwickelte *WHO adapted Prognostic Scoring System* (WPSS) (Tabelle 1.5) (Malcovati *et al.*, 2007).

Tabelle 1.5 Variablen und Gewichtung des WPSS

Variable	Gewichtung			
	0	1	2	3
WHO Kategorie	RA, RARS, 5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotyp	<i>good risk</i>	<i>intermediate risk</i>	<i>poor risk</i>	
Transfusionsbedarf	Nein	regelmäßig		

Der klonale Charakter der myelodysplastischen Syndrome konnte 1990 durch X-Chromosom-Inaktivierungsmuster (XCIP) nachgewiesen werden (Tefferi *et al.*, 1990). Die genetischen Läsionen und molekularen Mechanismen, die für die Initiierung eines MDS verantwortlich sind, haben sich bislang nicht identifizieren lassen.

Chromosomenaberrationen finden sich in ca. 50% der primären und in bis zu 80% der Therapie-assoziierten myelodysplastischen Syndrome (Hasse *et al.*, 2007, Sole *et al.*, 2000 und 2005, Le Beau 1986), wobei es sich in den meisten Fällen um den Verlust von genetischem Material handelt und nur selten um Translokationen. Etwa 30% der Patienten haben nur eine mikroskopisch erkennbare Chromosomenaberration, 9% weisen zwei solcher Anomalien auf und 14% sind von komplexen Chromosomenaberrationen (≥ 3) betroffen. Die häufigsten Anomalien sind Deletionen der Chromosomen 5, 7, 18 und 20, Monosomie 7 und Trisomie 8, die zusammen etwa 80% aller Karyotyp-Anomalien bei MDS ausmachen (Haase *et al.*, 2007).

Im Rahmen der Entwicklung des IPSS wurden 1997 drei zytogenetische Risikogruppen etabliert (Greenberg *et al.*, 1997):

- *Good risk*: normaler Karyotyp, isolierte Y-Deletion, isolierte 5q-Deletion und isolierte 20q-Deletion
- *Poor risk*: komplexer Karyotyp und/oder eine Aberration des Chromosoms 7
- *Intermediate risk*: alle anderen Aberrationen.

Neueren Daten der Deutsch-Österreichischen MDS-Gruppe zufolge haben Patienten mit Translokation des langen Arms von Chromosom 7 (medianes Überleben 35 Monate) und Patienten mit einer Monosomie 7 (medianes Überleben 14 Monate) eine bessere Prognose als bisher angenommen (medianes Überleben bei komplexem Karyotyp 9 Monate). Der Anteil der prognostisch schlechten Aberrationen nimmt in den FAB-Subtypen mit höherem Blastenanteil zu und ist in der Gruppe der Therapie-assoziierten myelodysplastischen Syndrome am höchsten. Dies trifft für die WHO-Subtypen nicht zu (Haase *et al.*, 2007).

Ein weiterer Faktor in der Pathogenese myelodysplastischer Syndrome ist die mitochondriale Dysfunktion, so ist zum Beispiel das Membranpotential der Erythroblasten bei Patienten mit RARS herabgesetzt (Matthes *et al.*, 2000). Weiterhin zeigen mononukleäre Knochenmarkzellen von MDS-Patienten einen statistisch signifikanten verringerten Sauerstoffverbrauch (Bowen *et al.*; 2002). Einen morphologischen Hinweis auf mitochondriale Dysfunktion liefern insbesondere die pathologischen Ringsideroblasten, die durch mitochondriale Eisenüberladung gekennzeichnet sind. Auf genetischer Ebene wurden bei 56% der MDS-Patienten heteroplasmische Mutationen der mtDNA gefunden (Wulfert *et al.*, 2008).

Ein weiterer bedeutender Faktor in der Pathogenese der myelodysplastischen Syndrome ist eine erhöhte Apoptose-Rate im Knochenmark, die vermutlich durch einen Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen sowie durch eine Dysregulation der T-Lymphozyten zustande kommt (Tefferi & Vardiman, 2009).

1.1.1.1 Myelodysplastische Syndrome mit Thrombozytose

Als Cabello *et al.* (2005) 317 MDS-Patienten evaluierten, fanden sie bei 7% eine Thrombozytose, diese ist also eher selten. Bei drei MDS-Subtypen kommt eine Thrombozytose jedoch häufiger vor, nämlich bei ca. 15% der Patienten mit RARS (Gattermann *et al.*, 1990; Germing *et al.*, 2000), außerdem bei Patienten mit isolierter Deletion des langen Arms von Chromosom 5 (5q-) (Sokal *et al.*, 1975; Cermak *et al.* 2003, Giagounidis *et al.*, 2006) und bei Patienten mit einer Aberration des langen Arms von Chromosom 3 (Jotterand *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 2000).

In der WHO-Klassifikation der hämatopoietischen und lymphoiden Neoplasien von 2001 (Jaffe und Harris 2001) wurde eine neue provisorische Kategorie eingeführt, die als „*myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable*“ bezeichnet wurde. Hierzu zählt neben der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) auch die refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (*refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis*; RARS-T).

Die Definitionskriterien für RARS-T waren:

- Thrombozytenzahl > 600.000/ μ l
- mehr als 15% Ringsideroblasten im Knochenmark
- Ausschluss von Chromosomenanomalien, die mit Thrombozytose einhergehen können (s.o.).

In der revidierten WHO-Klassifikation von 2008 wurde der Schwellenwert für die Thrombozyten auf 450.000/ μ l gesenkt, um eine Harmonisierung mit den Diagnosekriterien für die essentielle Thrombozythämie zu erreichen. Weiterhin werden für die Diagnose einer RARS-T jetzt auffällig große Megakaryozyten im Knochenmark gefordert, ähnlich wie bei ET (Brunnering *et al.*, in Swerdlow *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wird für die RARS-T noch eine Thrombozytose von >600.000/ μ l zugrunde gelegt, so wie es bislang in der Fachliteratur üblich war.

1.1.1.2 MDS mit isolierter Deletion (5q)

MDS mit isolierter Deletion (5q), das seit der WHO-Klassifikation von 2001 eine eigene Entität bildet, zeichnet sich klinisch durch makrozytäre Anämie, moderate Leukopenie, normale oder erhöhte Thrombozytenzahl, charakteristisch hypolobulierte (mononukleäre) Megakaryozyten, niedriges Risiko einer AML-Transformation und insgesamt gute Prognose aus. Außerdem sind deutlich mehr weibliche als männliche Patienten betroffen (Verhältnis 7:3) (Jaffe und Harris, 2001; Giagounidis *et al.*, 2006). Das Chromosom 5 codiert für Tumorsuppressorgene und zahlreiche Gene, die für die Regulation der Hämatopoiese wichtig sind. Dazu zählen Zytokine, Zytokinrezeptoren, Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren und Signalmediatoren. Der klonale Ursprung des MDS mit isolierter Deletion (5q) konnte durch Nilsson *et al.* 2000 nachgewiesen werden. Die am häufigsten deletierte Region ist del(5)(q13q33). In fast allen Fällen ist die Bande 5q31 betroffen. Auf der Suche nach dem für die Klinik des MDS mit isolierter Deletion (5q) verantwortlichen Gens konnte eine „*critical deleted region*“ lokalisiert werden. Diese muss von der Region 5q31.1 unterschieden werden, die bei AML und anderen MDS-Typen häufig im Rahmen eines komplexen Karyotyps deletiert ist und eher mit einer schlechten Prognose einhergeht. Trotz Eingrenzung der möglichen pathogenetisch relevanten Gene ist es nicht gelungen, ein bestimmtes Gen als alleinige Ursache des MDS mit isolierter Del (5q) zu definieren. Wahrscheinlich beruht der Phänotyp auf einem Gendosiseffekt im Sinne der Haploinsuffizienz eines oder mehrerer Gene.

1.1.2 Die myeloproliferativen Syndrome

Die myeloproliferativen Syndrome (MPS) sind Knochenmarkserkrankungen, die durch gesteigerte Proliferation myeloischer Zellen gekennzeichnet sind. Dabei können klinisch mehrere myeloische Zellreihen oder nur die Erythropoiese oder Megakaryopoiese im Vordergrund stehen (Skoda, 2007). Im Gegensatz zu den MDS zeigen die MPS keine wesentlichen Proliferationsstörungen. Zu den MPS zählen nach der neuesten WHO-Klassifikation (Brunner *et al.*, in Swerdlow *et al.*, 2008) die chronische myeloische Leukämie (CML), die Polyzythämia vera (PV), die essentielle Thrombozythämie (ET), die idiopathische Myelofibrose (IMF), die chronische Neutrophilen-Leukämie (CNL), die chronische eosinophile Leukämie (CEL), die systemische Mastozytose, das hypereosinophile Syndrom sowie unklassifizierbare MPS, die jedoch extrem selten sind. Den Zusammenhang zwischen den drei erstgenannten Erkrankungen erkannte 1951 erstmals Dameshek. Adamson *et al.* konnten dann 1976 den klonalen Ursprung der MPS mit Hilfe der X-Chromosom-Inaktivierungsmuster (XCIP) nachweisen. Ein Teil der Patienten mit MPS weisen in den kranken Knochenmarkszellen Chromosomenanomalien auf (ca. 15% bei PV, 5% bei ET, 35% bei IMF und 100% bei CML). Die häufigsten Aberrationen bei PV sind Trisomie 1, 8 und 9 sowie die Deletion 20q. Bei IMF finden sich am häufigsten die Deletionen 13q und 20q. Weiterhin auffällig bei jeweils ca. 30% der PV- und IMF-Patienten ist die Region 9p, in der häufig ein Verlust der Heterozygotie vorliegt. 2005 wurde von vier Arbeitsgruppen gleichzeitig beschrieben (Kralovics *et al.*, Baxter *et al.*, Levine *et al.*, James *et al.*), dass sich bei myeloproliferativen Syndromen häufig die somatische Punktmutation JAK2 V617F nachweisen lässt (Tabelle 1.6).

Tabelle 1.6: Häufigkeit der JAK2 V617F-Mutation bei myeloproliferativen Syndromen (in Klammern der Anteil der homozygoten Mutation)

	PV	ET	IMF
	JAK2 V617F in %	JAK2 V617F in %	JAK2 V617F in %
James <i>et al.</i>	89 (30)	43	43
Levine <i>et al.</i>	74 (25)	32 (3)	35 (9)
Kralovics <i>et al.</i>	65 (27)	23 (3)	57 (22)
Baxter <i>et al.</i>	97 (26)	57 (0)	50 (19)
Jones <i>et al.</i>	81 (33)	41 (7)	43 (29)
Mittelwert	99	72	39

1.2 Targets der Mutationsanalysen bei MDS-Patienten

1.2.1 Der JAK/STAT Signaltransduktionsweg

Der JAK/STAT Signaltransduktionsweg ist einer der wichtigsten Signalwege der Zytokinrezeptoren. Derzeit sind vier Janus-Kinasen bekannt (JAK1, JAK2, JAK3, Tyrosinkinase 2 [TYK2]), diese sind auf der zytoplasmatischen Seite von Zytokinrezeptoren lokalisiert und üben dort ihre Funktion als Phosphotyrosinkinasen aus.

1.2.1.1 JAK2

JAK2 besteht aus 7 JAK-Homologie-Domänen (JH1-JH7). Die C-terminale JH1 ist die Kinase-Domäne, N-terminal davon ist die Pseudokinase-Domäne (JH2), die das Enzym in unstimuliertem Zustand inhibiert. Die Domänen JH3-JH7 bewirken die Rezeptorbindung.

1.2.1.2 JAK2 V617F

Punktmutationen, die den Aminosäureaustausch V617F im JAK2-Gen bewirken, führen in hämatopoietischen Zellen zu Hypersensitivität bzw. Unabhängigkeit gegenüber Wachstumsfaktoren. Der Austausch der Aminosäure Valin gegen die aromatische Aminosäure Phenylalanin in der Pseudokinase-Domäne des JAK2-Gens bedingt, dass die Pseudokinase-Domäne den Aktivierungs-Loop der Kinase-Domäne nicht mehr blockieren kann. Somit kommt es zur konstitutiven Aktivierung der JAK2 (Baxter *et al.*, 2005). Die Hypersensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren erklärt sich dadurch, dass nach Bindung eines Liganden und konsekutiver Konformationsänderung des Rezeptors die Transphosphorylierung des mutierten JAK-Enzyms erleichtert ist.

Steensma *et al.* (2005) konnten eine JAK2-Mutation bei 5 von 101 MDS-Patienten nachweisen. Ohyashiki *et al.* untersuchten Patienten, die als Folge verschiedener Knochenmarkserkrankungen eine Myelofibrose (MF) entwickelt hatten und fanden die JAK2 V617F-Mutation bei zwei von sechs MDS-Patienten mit MF (2005). Bei 38 MDS-Patienten ohne MF fanden sie die Mutation nicht.

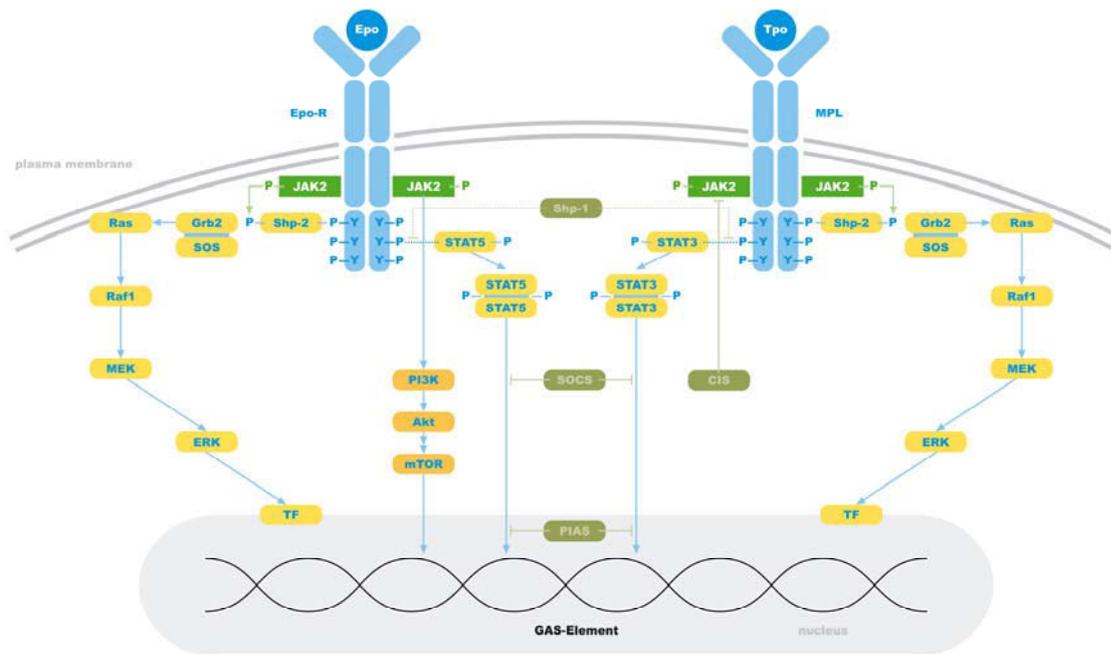


Abbildung 1.1 Signaltransduktion über JAK2

Die Bindung des Liganden, z.B. EPO, an den entsprechenden Zytokinrezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die es JAK2 ermöglicht, sich zu transphosphorylieren und damit in den aktivierten Zustand überzugehen. Im aktivierten Zustand phosphorylieren Janus-Kinasen Tyrosinreste auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors. Letztere fungieren als Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domäne, z.B. STAT-Proteine (*signal transducers and activators of transcription*). Nach der Bindung werden die STATs durch Janus-Kinasen phosphoryliert, verlassen dann den Rezeptor, um Homo- oder Heterodimere zu bilden und in den Nucleus zu translozieren, wo sie an der DNA an das sog. GAS-Element 5' TT(N4-6)AA 3' binden und dadurch Koaktivatoren stimulieren. Die Signalkaskade führt letztlich zur Expression, selten auch Repression, bestimmter Zielproteine.

Gleichzeitig mit der Bindung der STATs kann die Tyrosinphosphatase Shp-2 an die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors binden. Über zwei Adapterproteine Grb2 und SOS wird das G-Protein Ras aktiviert, durch eine weitere Kaskade wird ERK aktiviert, die ihrerseits weitere Transkriptionsfaktoren phosphoryliert.

Die Janus-Kinase aktiviert außerdem den PI3-Kinase-Signalweg.

Der JAK2/STAT-Signalweg wird über zahlreiche Wege reguliert und inhibiert. Verschiedene spezifische Inhibitoren sind bekannt. Eine direkte Feedback-Hemmung erfolgt durch die SOCS (*suppressor of cytokine signalling*). CIS (*cytokine inducible SH2 containin g protein*) wird durch dimerisierte STATs induziert, lagert sich an einen phosphorylierten Tyrosinrest des Erythropoietin-Rezeptors (EpoR) und verhindert so die Bindung von STAT5.

PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*) verhindern die Bindung der dimerisierten STATs an die DNA und rekrutieren Ko-Faktoren, die eine Regression der Gene induzieren. Shp1 ist eine Phosphatase, die ebenfalls abschwächend auf die Signaltransduktion des entsprechenden Liganden wirkt, indem sie JAK- und STAT-Moleküle dephosphoryliert.

1.2.2 Der TPO-Rezeptor MPL

MPL ist der Thrombopoietinrezeptor, der aus einer einzigen transmembranen Polypeptidkette besteht. Es wurden zwei verschiedene Spleißvarianten beschrieben. MPL wird auf Megakaryozyten und Thrombozyten sowie auf hämatopoietischen Stammzellen (HSZ) exprimiert (Tamura *et al.*, 1998). Die Bindung des Liganden induziert eine Konformationsänderung, die zur Bildung eines homodimeren Rezeptorkomplexes führt und die Transphosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase JAK2 und TYK2 ermöglicht (Abe *et al.*, 2002). Die weitere Signalkaskade entspricht den oben beschriebenen JAK/STAT-, ERK- und PI3K-Signaltransduktionswegen.

1.2.2.1 MPL W515 L/K

Pikmann *et al.* suchten 2006 bei Patienten mit JAK2 V617F-negativer ET, PV oder IMF nach Mutationen in den Rezeptoren für hämatopoietische Wachstumsfaktoren (EPO, TPO, G-CSF). Bei 4 von 45 Patienten mit IMF fanden sie in der Granulozyten-DNA einen Ersatz von Guanin durch Thymin im Nukleotid 1544 des MPL-Gens, der zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Leucin in Codon 515 führte. Dieses Codon liegt in der Transmembran-Domäne. In vitro wurde gezeigt, dass die Mutation MPL W515L ein Zytokin-unabhängiges Wachstum ermöglicht, ähnlich wie für JAK2 V617F beschrieben. Es konnte eine konstitutive Aktivierung von JAK2, TYK2, STAT3, STAT5, ERK/MAPK und PI3K/Akt nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine Hypersensitivität für TPO. Transfizierte Mäuse bildeten das Vollbild eines myeloproliferativen Syndroms aus.

Dieselbe Arbeitsgruppe fand beim Screening von 1182 Patienten mit myeloischen Erkrankungen 16 weitere Patienten, die eine MPL W515L-Mutation trugen, davon 12 Patienten mit IMF, 4 Patienten mit ET, 1 Patient mit MF nach ET und 3 Patienten mit Blastenkrisis einer IMF. Außerdem fanden die Autoren bei 5 Patienten statt MPL W515L die Mutation MPL W515K. Bei 2 Patienten lagen alle 3 bekannten Allele für MPL W515 vor. Schließlich fanden sich noch 6 Patienten, die sowohl die JAK2 V617F-Mutation als auch die MPL W515F-Mutation aufwiesen.

Guglielmelli *et al.* untersuchten 217 MF-Patienten und fanden MPL W515K/L in 8,2% der Fälle (2007).

1.3 Alterungsmechanismen

Der zweite Teil der Doktorarbeit wurde im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs GK 1033 (Altersforschung) durchgeführt. Dessen inhaltlicher Zusammenhang mit dem Thema MDS ergibt sich erstens aus der Tatsache, dass das mediane Alter von MDS-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 70 Jahre beträgt und zweitens daraus, dass Mitochondrien einerseits eine wichtige Rolle bei altersabhängigen degenerativen Prozessen zu spielen scheinen und außerdem verdächtigt werden, an der Pathogenese myelodysplastischer Syndrome beteiligt zu sein. Die wichtigsten bislang bekannten molekularen Alterungsmechanismen werden im Folgenden kurz genannt.

1.3.1 Genomische Instabilität

Es existieren verschiedene zellzyklusabhängige Mechanismen, um DNA-Schäden zu detektieren und zu reparieren. Im Rahmen der zellulären Alterung kommt es jedoch zu verstärkter genomischer Instabilität. Wenn in Maus-Modellen bestimmte Proteine, z.B. p53 und ATM-Kinasen, die zur genomischen Stabilität beitragen, mutiert sind, kommt es zu progeroiden Phänotypen. Verminderte Aktivität diverser mitotischer Checkpoint-Gene hat einen ähnlichen Effekt (Lombard *et al.*, 2005 Hoeijmakers *et al.*, 2009).

1.3.2 Telomerverkürzung

Telomere sind komplexe Strukturen am Ende der Chromosomen, die zur genomischen Stabilität beitragen, indem sie Chromosomen vor einer End-zu-End-Fusion mit anderen Chromosomen schützen. Außerdem wirken die Telomere dem Problem der Chromosomenverkürzung bei der DNA-Replikation entgegen. Trotzdem kommt es altersabhängig im Allgemeinen zu einer Telomerverkürzung. Bestimmte Zellen, wie z.B. hämatopoietische Stammzellen, können jedoch mithilfe von Telomerase oder alternativen Mechanismen die Verkürzung der Telomer-DNA verhindern (Finkel *et al.*, 2007).

1.3.3 Die mitochondriale Alterungstheorie

Die mitochondriale Alterungstheorie oder auch „Theorie des Alterns durch freie Radikale“ nach Harman (1956 und 2006) besagt, dass es vor allem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu altersabhängig akkumulierenden Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) kommt. Mitochondrien sind der Hauptentstehungsort von ROS. In defekten Mitochondrien kann die Produktion von ROS noch deutlich verstärkt sein, was wiederum eine vermehrte Schädigung der mtDNA nach sich zieht. Die altersabhängige Akkumulation von Deletionen und Punktmutationen der mtDNA ist nicht nur in postmitotischen Zellen wie z.B. Kardiomyozyten (Coller *et al.*, 2002), sondern auch in Stammzellen, beispielsweise denen des Gastrointestinaltrakts (Taylor *et al.*, 2003) oder des Knochenmarks (Shin *et al.*, 2004) gut dokumentiert. Es wird jedoch weiterhin diskutiert, wie stark mtDNA-Mutationen und mitochondriale Funktionsstörungen am Alterungsprozess von Zellen und Gewebe beteiligt sind.

1.4. Mortalin

Mortalin (auch bekannt unter folgenden Bezeichnungen: HSPA9B / mtHSP70 / GRP75 / PBP74 / mot-2) ist ein ubiquitär exprimiertes mitochondriales Chaperon, das zur Familie der HSP70-Chaperone gehört. Das Molekül ist hauptsächlich in Mitochondrien, konnte aber auch im endoplasmatischen Retikulum, der Plasmamembran, im Zytoplasma und in zytoplasmatischen Vesikeln nachgewiesen werden (Ran *et al.*, 2000). Mortalin ist Bestandteil der mitochondrialen Importmaschinerie, die sich vor allem auf die Transmembrankomplexe TOM und TIM stützt (Abbildung 1.2). Mortalin ist die einzige Komponente der Importmaschinerie, die ATP spalten kann und nimmt damit eine wichtige Motorfunktion wahr. Außerdem ist Mortalin maßgeblich an der korrekten Faltung der importierten mitochondrialen Proteine beteiligt.

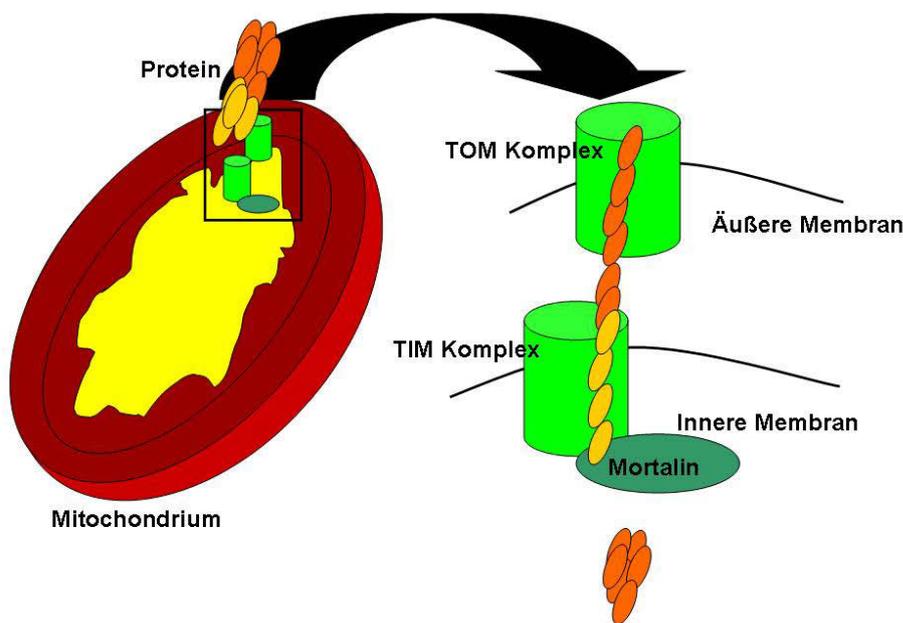


Abbildung 1.2 Importmaschinerie der Mitochondrien

Proteinimport ins Mitochondrium erfolgt posttranslational. Die Importprozesse erfolgen über den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) der äußeren Mitochondrienmembran sowie den TIM-Komplex (*translocase of the inner membrane*). Die Proteine verfügen über eine Signalsequenz (in gold darstellt). Während des Transportes werden die Proteine entfaltet um in der Matrix des Mitochondriums mit Hilfe des Chaperons Mortalin mit ATP-Verbrauch wieder gefaltet zu werden. Die Signalsequenz wird abgespalten.

1.4.1 Mortalin und MDS

Das Gen für Mortalin liegt auf dem langen Arm von Chromosom 5 in der „*critical deleted region*“ des MDS mit isolierter Deletion (5q). Außerdem konnte 2005 gezeigt werden, dass eine Punktmutation von Mortalin der Zebrafisch-Mutante „*crimsonless (crs)*“ zugrunde liegt, die durch ausgeprägte Störung der Hämatopoiese, insbesondere der Erythropoiese, gekennzeichnet ist. Der Defekt hat große Ähnlichkeit mit den Veränderungen bei myelodysplastischen Syndromen. Die Mortalin-Punktmutation führt zu erhöhter Produktion von ROS vornehmlich in hämatopoietischen Zellen (Craven *et al.* 2005). Chen *et al.* konnten 2007 zeigen, dass herabgesetzte Expression von Mortalin in CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut zu abnormaler Proliferation, erhöhter Apoptose-Rate und verzögerter Differenzierung führt.

1.4.2 Mortalin und Alterung

Mortalin spielt anscheinend auch eine Rolle bei der zellulären Seneszenz (Yaguchi *et al.*, 2007). Überexpression des Mortalin-Orthologs in *C. elegans* und in humanen Fibroblasten führt zu einer verlängerten Lebenszeit des Fadenwurms bzw. der Zellen (Yokoyama *et al.*; 2002 Kaul *et al.* 2000). Wadhwa *et al.* konnten 2006 zeigen, dass die Mortalin-Expression auch in diversen Krebszellen sowie in immortalisierten Zellen erhöht ist. Auffällig ist eine unterschiedliche intrazelluläre Distribution von Mortalin in immortalisierten und mortalen Zellen. In immortalisierten Zellen findet sich eine perinukleäre Konzentration von Mortalin, während in normalen Zellen Mortalin im gesamten Zytoplasma verteilt ist (Wadhwa *et al.*, 1993).

1.5 Komorbidität bei MDS-Patienten

Im dritten Teil dieser Doktorarbeit wurde eine ganz andere, klinisch unmittelbar relevante Ebene der MDS-Forschung betreten, indem Art und Häufigkeit von Komorbiditäten untersucht wurde.

Myelodysplastische Syndrome sind, wie unter 1.1 beschrieben, eine heterogene Gruppe von Knochenmarkerkrankungen, von denen bevorzugt ältere Menschen betroffen sind (siehe auch 1.3). Bei älteren Patienten ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass neben der untersuchten Erkrankung (Index-Erkrankung) weitere Erkrankungen bestehen, die sogenannten Komorbiditäten (Extermann, 2000). Komorbidität wurde von Feinstein folgendermaßen definiert: „*Any distinct clinical entity that has existed or may occur during the clinical course of a patient who has a condition under study*” (1970). Komorbiditäten spielen in der täglichen Entscheidungsfindung eine wichtige Rolle (Piccirillo *et al.*, 1996). Einerseits kann es passieren, dass eine potentiell kurative Therapie nicht angeboten werden kann, weil die Gesamtkonstitution des Patienten durch Komorbidität so eingeschränkt ist, dass die Nebenwirkungen der Therapie wahrscheinlich nicht überlebt würden. Es konnte gezeigt werden, dass medizinische Unterversorgung, die mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht, häufig auf Komorbiditäten zurückzuführen ist (Piccirillo *et al.*, 2004, Bouchardy *et al.*, 2003). Andererseits ist zu berücksichtigen, dass ein älterer Patient ohne Komorbidität gegebenenfalls genauso intensiv therapiert werden kann wie ein jüngerer Patient.

1.5.1 Werkzeuge zur Erfassung von Komorbidität

1.5.1.1 Der Charlson-Komorbiditäts-Index

Der Charlson-Komorbiditäts-Index (CCI) wurde von Mary Charlson (1987) auf der Basis der Mortalität stationärer Patienten in der Inneren Medizin entwickelt. Es handelt sich um einen Score mit 19 Parametern, die nach der relativen Wahrscheinlichkeit, an der Erkrankung zu versterben, gewichtet sind (im Vergleich zu Patienten, die nicht an der Erkrankung leiden) (siehe Tabelle 1.7). Dieser Score kann retrospektiv anhand der Krankenakten erhoben werden. Eine optionale Ergänzung berücksichtigt das Alter, wobei für jede Dekade ein Punkt hinzugezählt wird (Charlson *et al.*, 1994). Anhand der Einzelpunktzahlen der verschiedenen Parameter errechnet sich eine Gesamtpunktzahl, die den Patienten einer Risikogruppe zuordnet. Als Niedrigrisikogruppe sind Patienten mit einem CCI von 0 definiert, als Intermediär-Risikogruppe Patienten mit einem CCI von 1, und in die Hochrisikogruppe fallen alle Patienten mit einem Score von 2 und mehr Punkten.

Tabelle 1.7 Parameter und Gewichtung des CCI

Myokardinfarkt	1	Diabetes mit Endorganschäden	2
Herzinsuffizienz	1	Hemiplegie	2
pAVK	1	Moderate oder schwere Niereninsuffizienz	2
Zerebrovaskuläre Insuffizienz	1	Zweite solide Neoplasie	2
Demenz	1	Leukämie	2
Chronische Lungenerkrankung	1	Lymphom, Multiples Myelom	2
Bindegewebserkrankung	1	Moderate oder schwere Lebererkrankung	3
Ulkerkrankung	1	Zweite metastasierte solide Neoplasie	6
Milde Lebererkrankung	1	AIDS	6
Diabetes ohne Komplikationen	1		

Bei soliden Tumoren konnte bereits gezeigt werden, dass der CCI Patienten mit guter und schlechter Prognose unterscheiden kann (Sabin *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1997; Lubke *et al.*, 2003).

1.5.1.2 Der Komorbiditäts-Index für Patienten mit hämatopoietischer SCT

Sorrer *et al.* entwickelten 2005 auf der Basis des CCI einen Komorbiditäts-Score speziell für Patienten mit AML oder MDS, die einer Transplantation mit hämatopoietischen Stammzellen (SCT) unterzogen werden sollen (hematopoietic cell transplantation comorbidity index, HCTCI). Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass einige der Parameter des CCI Ausschlusskriterien für eine SCT darstellen, wie z.B. schwere Lungenerkrankungen. Desweiteren vergibt der CCI 2 Punkte für Leukämie, obwohl der Übergang in eine Leukämie bei MDS-Patienten nicht als Komorbidität, sondern als Komplikation der Index-Erkrankung zu werten ist. Dementsprechend wurde für einige Parameter die Definition modifiziert, andere wurden ausgeschlossen. Schließlich wurden 3 zusätzliche Parameter integriert: Adipositas, Infektion und psychische Beeinträchtigung (Tabelle 1.8).

Auch der HCTCI definiert 3 Risikogruppen: 0 Punkte entspricht niedrigem Risiko, 1-2 Punkte entspricht intermediärem Risiko, und 3 oder mehr Punkte entspricht hohem Risiko (Sorrer *et al.*, 2005).

Tabelle 1.8 Parameter und Gewichtung des HCTCI

Arrhythmien	1	Rheumatologische Erkrankung	2
Herzerkrankung	1	Ulkerkrankung	2
Chronische entzündliche Darmerkrankung	1	Moderate oder schwere Niereninsuffizienz	2
Zerebrovaskuläre Insuffizienz	1	Moderate Lungenerkrankung	2
Diabetes	1	Frühere solide Neoplasie	2
Psychartrische Erkrankung	1	Herzklappenerkrankung	3
Leichte Lebererkrankung	1	Schwere Lungenerkrankung	3
Adipositas	1	Moderate oder schwere Lebererkrankung	3
Infektion	1		

1.6 Zielsetzung

Im ersten Teil der Doktorarbeit sollte überprüft werden, ob die Mutationen JAK2 V617F und MPL W515L/K, die bei myeloproliferativen Erkrankungen entdeckt wurden, auch bei myelodysplastischen Syndromen vorkommen. Dabei sollten MDS-Patienten mit Thrombozytose im Vordergrund stehen, da hier ein ähnlicher Proliferationsvorteil wie bei den myeloproliferativen Erkrankungen vermutet werden kann. Patienten mit Thrombozytose findet man beim MDS mit isolierter Deletion (5q), ganz besonderes aber bei der RARS-T, die gemäß neuester WHO-Klassifikation als myelodysplastisches / myeloproliferatives *Overlap*-Syndrom klassifiziert wird.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit sollte fluoreszenzmikroskopisch die intrazelluläre Verteilung von Mortalin untersucht werden, um zwei Fragestellungen zu bearbeiten:

- 1) Welche Art der intrazellulären Distribution von Mortalin findet sich bei myelodysplastischen Syndromen? Gibt es einen Unterschied zwischen jung und alt oder zwischen benigne und maligne? Ähneln die Verteilung dem Muster bei Tumorzellen?
- 2) Wird Mortalin bei der Mitose hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt? Hiermit sollte der Vermutung nachgegangen werden, dass Stammzellen, die in die Differenzierung eintreten, stärker mit Mitochondrien ausgestattet werden als jene, die in der Stammzellnische verbleiben und ihre „Stemness“ bewahren. Weiterhin sollte überprüft werden, ob es alters- und krankheitsassoziierte Veränderungen in der Mitochondrien-Verteilung gibt.

Im dritten Teil der Doktorarbeit sollte überprüft werden, wie häufig Komorbidität bei MDS-Patienten vorkommt, ob es bevorzugte Komorbiditäten gibt und in welchem Zusammenhang Komorbiditäten mit den bisher üblichen Prognose-Scores stehen.

II Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Stammlösungen und Puffer

Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)

WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Sigma, Seelze/Hannover

Ethidiumbromid

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Methanol

Roth, Karlsruhe

Trypanblau

Sigma, Seelze/Hannover

Paraformaldehyd (PFA) Fixierungslösung

Stammlösung 8%

8% PFA (Sigma, Seelze, Hannover), NaOH, HCl zum Einstellen des pH-Wertes, in PBS

5x TBE

54 g Tris (Merck), 27,5 g Borsäure (Merck), 4,65 g EDTA (Roth), mit H₂O ad 1l

DNA-Größenmarker

100 bp DNA Ladder, Promega, Madison, USA

Der Marker besteht aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten der Größen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 2x500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp und 1500 bp. Die Konzentration beträgt 130 ng DNA in 1 µl Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,5).

Eindeckelmedium

100 µl Mowiol 4-88 (Roth, Karlsruhe), 1 Körnchen DAPCO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan), 1:20000 DAPI (4',6-Diamino-2-phenyllindol Dihydrochlorid) (Roth, Karlsruhe) ad 1 ml 75% Glyzerin 50 mg/ml Propylgallat.

Gel-Ladepuffer für native Agarosegele

Blue/Orange 6x Loading Dye, Promega, Madison, USA enthält:

15% Ficoll400, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol FF, 0,4% Orange G, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 50 mM EDTA.

Isoton II Diluent

Beckman Coulter, Krefeld

Lysepuffer

Zentralapotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf

8,29 g/l NH₄Cl; 1 g/l KHCO₃, 0,0375 g/l Na₂-EDTA, pH 7,4

MACS-Puffer

0,5% BSA (Roth, Karlsruhe) und 2 mM EDTA (Sigma, Seelze/Hannover) in PBS, pH 7,3

PBS

Serrag Wiessner, Nalia/Bayern

8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, KH₂PO₄ 0,25 g/Na₂HPO₄ H₂O 1,35 g/l, pH 7,3

Permeabilisierungspuffer für Suspensionszellen

0,1% Triton X-100 (Sigma, Seelze/Hannover) und 10% FBS (Biochrom) in Isoton (Beckmann Coulter)

Triton X100

Roth, Karlsruhe

Tween 20

Roth, Karlsruhe

2.1.2 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Die Herstellung der Zellkulturmedien erfolgte unter sterilen Bedingungen, dazu wurden die Medien vor Gebrauch mit einer Vakuumpumpe durch einen Flaschenaufsatz-Filter (Porengröße 0,22µm) in autoklavierte Schottflaschen steril filtriert. Spätestens eine Woche nach dem Ansetzen wurden Zellkulturmedien vor weiterem Gebrauch erneut steril filtriert und erneut mit entsprechenden Mengen an L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) versetzt.

Iscoves 20 (I20)

Für 100 ml wird benötigt:

80 ml	IMDM	(Lonza, Köln)
20 ml	FCS	(Biochrom, Berlin)
100 U/ml	L-Glutamin	(Gibco, Karlsruhe)
100 U/ml	Pen/Strep	(Gibco, Karlsruhe)

I20 mit Wachstumsfaktoren (I20⁺⁺⁺)

Für 100 ml werden benötigt:

100 ml	I20	(s.o.)
10 ng/ml	Flt3-L	(PeproTech, Hamburg)
10 ng/ml	SCF	(PeproTech, Hamburg)
10 ng/ml	TPO	(PeproTech, Hamburg)

2.1.3 Primäre Zellen

Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus Knochenmarkaspirat von MDS-Patienten und gesunden Spendern isoliert.

Humane CD34⁺-Zellen wurden aus Knochenmarkaspirat von MDS-Patienten und gesunden Spendern oder aus G-CSF-mobilisiertem Apheresat von Stammzellspendern isoliert.

2.1.4 Patienten

Insgesamt wurde Material von 101 Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, zwei Knochenmarksproben von hämatologisch gesunden älteren Probanden und 11 G-CSF-mobilisierte Apheresate von Stammzellspendern untersucht.

Es wurden 90 Proben aus Knochenmark oder peripherem Blut auf das Vorliegen der V617F-Mutation im Gen der Tyrosinkinase JAK2 und teilweise auch bzgl. der W515L/K-Mutation im MPL-Gen untersucht. Für die letztgenannte Untersuchung wurden Patienten mit isolierter 5q- Chromosomenanomalie oder aufgrund einer Thrombozytose von $\geq 500.000/\mu\text{l}$ ausgewählt. In Tabelle 2.1 sind einige klinische Charakteristika und Laborbefunde der Patienten aufgeführt.

In 11 Fällen wurden CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark aufgereinigt und soweit möglich hinsichtlich der intrazellulären Distribution von Mortalin untersucht.

2.1.4.1 Knochenmark

Das mit Heparin antikoagulierte Aspirat von diagnostischen Beckenkammpunktionen wurde verwendet, um unverzüglich CD34⁺-Zellen zu isolieren. DNA wurde auch aus eingefrorenen KM-Aspiraten gewonnen. Alternativ wurde DNA aus abgeschabtem Zellmaterial von ungefärbten Knochenmarkausstrichen isoliert. Die von Objektträgern extrahierten Proben enthielten deutlich weniger DNA, so dass einige Proben noch eingeeengt wurden (s.u.).

Tabelle 2.1: Charakteristika der Patienten für molekulare Analysen
 DX=Zeitpunkt der Diagnose, n.d.=nicht durchgeführt; RS=Ringsideroblasten

Nr.	Geburts-Datum	Diagnose-Datum	Alter bei Diagnose	follow up	follow up in Monaten	Schicksal	FAB	WHO	Hb DX(g/dl)	WBC DX (/µl)	Thr DX (x10 ³ /µl)	% RS	Karyotyp
0	18.09.1932	14.06.2000	68	03.02.2009	104	lebend	RAEB	RAEB I	12	2500	20	0	normal
1	07.05.1948	15.07.2003	55	31.12.2008	65	lebend	RA	RCMD					Monosomie X
2	02.10.1939	23.12.2005	66	11.08.2008	32	lebend	RA	RCMD				8	normal
3	11.03.1937	15.06.2006	69	11.08.2008	26	lebend	n.d.	RAEB I					n.d.
4	01.01.1948	15.10.2007					ICUS						
5	25.11.1933	17.06.2006	73	11.12.2008	30	lebend	RA	RCMD	10	1700	38		Deletion 7q
6	12.05.1926	15.03.2004	78	15.11.2008	56	lebend	n.d.	unclass	13,2	2350	139		normal
7	20.05.1947	07.04.2004	57	04.03.2008	47	lebend	RA	RCMD	10,4	5200	346		n.d.
8	29.12.1943	06.03.2008	64	16.02.2009	11	lebend	RA	RCMD	16,6	4800	63		n.d.
9	11.05.1939	19.10.2005	66	09.06.2008	32	lebend	RAEB	RAEB I					Trisomie 8
10	07.06.1983	06.06.2000	17	15.07.2008	97	lebend	RA	RCMD	7,6	5300	542	0	normal
114	06.05.1932	13.01.1989	57	11.04.1992	39	verstorben	RA	RCMD	7,1	4200	650	3	normal
157	27.02.1915	15.10.1996	82	10.03.1998	17	verstorben	RARS	5q-	9,3	7000	417	37	Deletion 5q
205	09.04.1921	06.01.1992	71	31.11.2000	106	lebend	RA	5q-	9,7	5100	231	5	Deletion 5q
213	13.11.1922	09.01.1990	67	01.11.1996	82	verstorben	RA	5q-	11,4	5500	28		Deletion 5q
221	16.06.1934	27.07.1992	58	12.08.2000	97	verstorben	RARS	RARS-T	9,6	9800	686	38	normal
223	11.02.1921	15.11.1989	69	04.05.2001	138	verstorben	RARS	5q-	6	3800	278	73	Deletion 5q
232	28.05.1925	31.05.1991	66	02.04.1996	59	verstorben	RARS	RARS-T	10,2	7140	1350	43	n.d.
277	30.12.1922	23.05.1996	73	04.03.1999	34	verstorben	RARS	RSCMD	7,5		572	21	Komplex
298	21.02.1913	19.12.1996	84	30.09.1998	21	verstorben	RAEB	RAEBII	9,3	11600	502		n.d.
336	09.02.1939	23.05.1997	58	17.10.1998		verstorben	RARS	RARS-T	6,1	7500	677		Deletion 11
355	22.11.1932	15.01.1997	64	15.10.1998	21	verstorben	RA	5q-	6,8	4700	108		Deletion 5q
421	09.06.1929	15.08.1996	67	24.07.2006	119	lebend	RARS	5q-	10,2	4700	458	49	Deletion 5q
427	18.12.1932	15.09.1999	67	18.05.2005	68	lebend	RA	5q-	6,6	4100	273	0	Deletion 5q
432	13.03.1947	03.04.1995	48	31.01.2006	129	lebend	RA	5q-	9,5	6300	676	0	Deletion 5q
456	28.02.1936	24.11.1988	53	10.01.1989	2	verstorben	RA	RCMD	5,9	8600	292	1	Komplex
477	24.01.1924	20.07.1999	75	04.11.2005	76	verstorben	RA	5q-	9,3	5800	181		Deletion 5q
497	15.02.1926	28.01.1997	71	30.06.2005	101	lebend	RA	5q-	11,8	2700	276	0	Deletion 5q

Nr.	Geburts-Datum	Diagnose-Datum	Alter bei Diagnose	follow up	follow up in Monaten	Schicksal	FAB	WHO	Hb DX(g/dl)	WBC DX (/µl)	Thr DX (x10 ³ /µl)	% RS	Karyotyp
504	17.06.1953	15.06.1986	33	30.06.2005	23	lebend	RA	5q-	11,4	3500	117	0	Deletion 5q
581	27.11.1919	17.04.2002	82	21.11.2004	34	verstorben	RA	5q-	9,1	5800	134		Deletion 5q
582	05.02.1932	23.03.2000	61	25.09.2000	23	verstorben	RA	5q-	7,1	4700	919	4	Deletion 5q
610	04.12.1940	14.03.2003	62	22.07.2003	12	verstorben	RA	5q-	10	2000	145	0	Deletion 5q
624	26.04.1924	29.02.2000	76	31.05.2003	80	verstorben	RARS	5q-	7,70	2600	65	16	Deletion 5q
655	31.07.1922	30.04.2004	82	24.03.2006	24	lebend	RARS	RSCMD	11,90	5300	552	29	n.d.
656	01.12.1930	30.09.2002	72	22.07.2005	74	lebend	RARS	RSCMD	9,30	4400	589	16	n.d.
672	24.06.1935	15.04.2004	69	10.03.2006	26	lebend	RA	5q-	8,90	4500	305		Deletion 5q
701	07.07.1929	18.01.1994	65	04.01.1995	27	verstorben	RA	5q	9,2	3100	97	41	Deletion 5q
702	16.10.1925	15.06.1985	60	12.02.1992	35	verstorben	RARS	5q-	7	1900	146	25	Deletion 5q
703	18.06.1939	16.11.1992	53	01.11.1994	20	verstorben	RA	5q-	8,5	5200	446	2	Deletion 5q
704	21.04.1930	18.12.1990	61	15.02.1997	135	verstorben	RA	5q-	12,3	1600	69	0	Deletion 5q
705	29.05.1941	01.05.1996	55	28.07.1998	38	verstorben	RA	5q-				0	Deletion 5q
706	05.08.1915	08.06.1991	76	08.09.1993	27	verstorben	RA	5q-	7,00	3900	281	0	Deletion 5q
707	21.12.1935	01.01.1998	62	15.12.2000	59	verstorben	RA	5q-	9,40	3500	167	0	Deletion 5q
708	14.12.1929	21.07.1998	69	19.03.2000	61	verstorben	RA	5q-	7,9	4240	749	0	Deletion 5q
709	24.10.1949	01.12.1994	45	10.03.2006	14	lebend	RA	5q-	6,8	5400	368	0	Deletion 5q
711								5q-					Deletion 5q
713	04.01.1945	15.04.2001	56	10.05.2006	61	verstorben	RA	5q-	6,8	5940	188	15	Deletion 5q
714	13.09.1938	15.04.2000	62	12.06.2001	14	verstorben	RA	5q-	8,8	5600	436	0	Deletion 5q
715	18.02.1933	08.03.2001	68	14.10.2004	43	verstorben	RA	5q-	9,1	4400	778	0	Deletion 5q
716	19.09.1937	17.05.2002	65	08.06.2005	37	lebend	RA	5q-	8,7	4160	239	0	Deletion 5q
717	19.07.1947	15.03.1996	49	21.06.2005	111	lebend	RARS	5q-	7,8	4960	387		Deletion 5q
718	13.03.1958	18.11.1997	40	22.07.2003	68	lebend	RA	5q-	4,3	2400	295		Deletion 5q
719	15.03.1957	15.02.2000	43	30.03.2006	73	lebend	RA	5q-	9,00	8500	727		Deletion 5q
720	14.01.1932	15.07.2001	70	30.06.2005	47	lebend	RA	5q-	9,3	5400	426		Deletion 5q
721	21.06.1931	15.04.1997	66	04.11.2004	91	verstorben	RA	5q-					Deletion 5q
722	18.10.1962	15.01.1999	36	03.04.2006	87	lebend	RA	5q-	7,4	4340	649	13	Deletion 5q
723	17.08.1938	15.07.1997	59	30.06.2005	95	lebend	RA	5q-				0	Deletion 5q
724	26.02.1951	15.07.2001	50	10.01.2006	54	lebend	CMML	CMMLI	14,5	39700	404		Trisomie 8

Nr.	Geburts-Datum	Diagnose-Datum	Alter bei Diagnose	follow up	follow up in Monaten	Schicksal	FAB	WHO	Hb DX(g/dl)	WBC DX (/µl)	Thr DX (x10 ³ /µl)	% RS	Karyotyp
725	14.04.1939	30.11.2001	63	15.10.2004	35	verstorben	RA	5q-	8,7	3000	240	0	Deletion 5q
726	04.06.1922	01.07.1998	76	15.01.2004	66	lebend	RA	5q-	9,3	3500	197	0	Deletion 5q
802	08.02.1913	13.09.1999	87	11.11.2004	62	lebend	RA	RCMD	7,30	4900	812	0	n.d.
803	10.2.1905	07.05.1979	74	05.09.1990	136	lebend	RARS	RSCMD	8,00	229	3500	30	n.d.
804	07.09.1915	15.11.2000	85	29.11.2004	48	lebend	RA	RCMD	10,40	5100	673	0	n.d.
805	20.04.1942	15.06.2000	58	06.01.2005	55	lebend	RA	RCMD	8,30	3800	624	0	normal
806	29.03.1942	28.07.2003	61	23.02.2005	19	lebend	RA	RCMD	8,80	7300	532	0	n.d.
807	30.05.1926	06.02.2004	78	22.02.2005	12	lebend	RA	RCMD	10,20	10700	1130	9	n.d.
808	04.05.1934	19.04.2004	70	15.02.2005	10	verstorben	RA	RA	7,90	5300	1190	0	n.d.
810	25.12.1934	26.10.2004	70	26.10.2004	0	lebend	RA	RCMD	12,90	6200	504	0	n.d.
811	15.01.1937	03.11.2004	68	03.11.2004	0	lebend	RA	RCMD	9,50	14700	969	0	n.d.
812	07.08.1952	04.02.2004	51	15.02.2005	12	verstorben	RAEB	RAEBII	7,50	2700	809	1	n.d.
813	26.06.1920	02.05.1997	77	28.09.2001	52	verstorben	RAEB	RARS	10,70	8200	283		n.d.
814	28.03.1950	15.01.2004	54	14.01.2006	24	verstorben	CMML	CMMLII	14,10	20700	907	1	n.d.
815	18.02.1935	17.08.2004	69	09.11.2004	3	verstorben	CMML	CMMLI	10,00	79000	513	0	n.d.
816	08.01.1922	17.01.1992	70	27.08.1994	31	verstorben	RAEB	RAEBI	7,70	5500	527	0	n.d.
817	02.09.1939	21.05.1992	53	01.12.1996	55	verstorben	RA	RCMD	8,60	8000	823	0	normal
818	17.09.1919	08.07.1989	70	02.12.1989	5	verstorben	RAEB	RAEBI	9,80	48000	580	0	n.d.
819	03.12.1919	08.12.2000	81	16.01.2001	1	verstorben	RA	RCMD	9,70	1900	1900	0	n.d.
820	29.05.1926	09.08.1990	64	15.10.1997	86	verstorben	RA	RCMD	7,50	6200	501	0	n.d.
821	17.06.1937	30.11.1984	47	21.07.1986	20	verstorben	RAEB-T	RAEB-T	7,80	13900	777	0	n.d.
822	05.03.1943	09.02.2006	63	26.07.2006	5	lebend	RAEB	RAEBI	9,60	4700	843	30	Komplex
823	09.06.1963	07.02.2001	38	24.09.2001	7	verstorben	RAEB	RAEBII	6,70	4800	507	0	Komplex
824	24.05.1927	12.08.2005	78	31.01.2006	5	lebend	RA	RCMD	8,30	8900	637	0	n.d.
825	15.07.1920	25.09.2003	83	22.08.2004	11	verstorben	RA	RCMD	10,70	2300	641	0	n.d.
826	30.05.1933	23.09.2003	70	27.10.2006	37	lebend	RA	RCMD	9,30	1400	637	3	Komplex
827	18.10.1909	15.03.1987	77	20.12.1994	93	verstorben	CMML	CMMLI	9,80	15300	675	6	n.d.
828	06.02.1911	09.08.1988	78	03.07.1990	23	lost	RARS	RARS-T	13,10	8700	957	44	n.d.
829	05.04.1915	30.06.1998	83	02.05.2001	35	verstorben	RA	RCMD	5,80	5500	604	0	n.d.
830	22.03.1905	04.05.1988	83	26.08.1988	3	verstorben	CMML	CMMLI	15,40	58000	507	0	n.d.

Nr.	Geburts-Datum	Diagnose-Datum	Alter bei Diagnose	Follow up	follow up in Monaten	Schicksal	FAB	WHO	Hb DX(g/dl)	WBC DX (/µl)	Thr DX (x10 ³ /µl)	% RS	Karyotyp
831	12.02.1919	04.04.2002	83	15.07.2002	3	verstorben	RA	RCMD	8,10	4900	1124		n.d.
832	22.12.1915	16.09.1996	81	17.03.2001	54	verstorben	RARS	RARS-T	8,90	9000	624	18	n.d.
833	13.01.1914	23.11.1988	75	02.01.1991	26	verstorben	RAEB-T	RAEBII	8,30	3000	770	0	n.d.
834	30.03.1934	15.07.1993	59	25.01.1994	6	verstorben	RAEB	RAEBII	5,20	2900	552		n.d.
835	16.11.1921	26.04.2002	80	13.08.2004	28	verstorben	RARS	RARS-T	9,10	6900	1105	60	n.d.
840	16.07.1916	27.06.2000	84	27.07.2000	1	lebend	RARS	RARS-T	7,4	32500	1.012	15	n.d.
841	01.04.1921	14.11.2001	81	15.12.2001	1	verstorben	RARS	RARS-T	5,20	20300	2100	15	n.d.
842	19.05.1927	15.05.1986	59	15.10.2005	233	lebend	RARS	RARS-T	10,90	8900	999	43	normal
843	02.01.1911	03.05.1999	88	31.10.1999	5	verstorben	RARS	RARS-T	9,10	17000	942	45	n.d.
844	24.02.1932	14.01.2005	73	16.10.2005	9	lebend	RARS	RARS-T	9,60	7300	695	19	normal
845	13.09.1941	18.02.2005	63	23.02.2006	12	lebend	RARS	RARS-T	7,30	2900	664	57	normal
710/809	22.11.1943	17.07.1997	54	28.09.2000	38	verstorben	RA	5q-	8,30	6900	770	0	Deletion 5q
712/836	24.09.1935	15.11.2000	65	30.10.2005	59	lebend	RA	5q-	8,40	3600	596		Deletion 5q

2.1.4.2 Vollblut

Durch Venenpunktion gewonnenes, mit EDTA antikoaguliertes Vollblut wurde bei minus 20°C eingefroren, um später DNA daraus zu isolieren.

2.1.4.3 Apheresat

Durch Apherese gewonnene Zellen wurden direkt nach Entnahme der immunmagnetischen CD34⁺-Aufreinigung zugeführt.

2.1.5 Antikörper und Farbstoffe

Für alle Analysen wurden Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet, die vom 488nm-Laser im Durchflusszytometer – oder unter der Quecksilber-Dampf-Lampe des Mikroskops - angeregt werden können. Unkonjugierte Antikörper wurden mit geeigneten Sekundärantikörpern kenntlich gemacht. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunchemischen Färbungen wurden Antikörper mit den Fluorochromen Alexa488 und Indocarbocyanin (Cy3) oder der Lebendfarbstoff Mitotracker CMXRos verwendet. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie waren Fluorescein-Iso-Thiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und der Konjugatfarbstoff Indodicarbocyanin-R-Phycoerythrin (PE-Cy5) oder der Lebendfarbstoff Mitotracker GreenFM. Ihr Emissionsmaximum bei der Anregung durch einen 488 nm Argon-Ionen-Laser ist in der folgenden Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2 Emissionsmaxima der Fluorochrome

Fluorochrom	Emissionsmaximum in nm
FITC	519
PE	578
PE-Cy5	670
Cy3	615
Alexa488	519
Mitotracker GreenFM	516
Mitotracker CMXRos	599

2.1.5.1 Konjugierte Antikörper

Target	Spezies	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller/ Klon
CD4	Maus	PE	1:25	BD/ RPA-T4
CD8	Maus	FITC	1:25	BD/ HIT8a
CD19	Maus	PE-Cy5	1:25	BD/ HIB19
CD34	Maus	PE-Cy5	1:25	BD
CD34	Maus	PE	1:25	BD/ 8G12
CD38	Maus	FITC	1:25	BD/ HB7
CD53	Maus	FITC	1:25	BioLegend/ HI29
CD62L	Maus	FITC	1:25	Immunotech/ MEL-14
CD63	Maus	FITC	1:25	BD/ H5C6
CD71	Maus	FITC	1:25	Immunotech/ YDJ 1.2.2
CD133	Maus	PE	1:25	Miltenyi Biotec/ 293C3
IgG	Maus	FITC	1:100	BD/ G18-145
IgG	Maus	PE	1:100	BD/ G18-145
IgG	Maus	PE-Cy5	1:100	BD/ G18-145

2.1.5.2 Nicht konjugierte Primärantikörper

Target	Spezies	Konzentration	Hersteller
Mortalin	Maus	1:1.000	BD
β-Aktin	Maus	1.2.500	Sigma/AC-15

2.1.5.3 Sekundärantikörper

Spezies	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
Ziege	Alexa488	1:1.000	Invitrogen
Esel	Cy3- Fab-Fragmente	1:200	Dianova

2.1.5.4 Farbstoffe

Target	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
Mitochondrien	Mitotracker CMXRos	1:20.000	Invitrogen
Mitochondrien	Mitotracker GreenFM	1:500-1:5.000	Invitrogen

2.1.6 MACS-Technologie

Die MACS-Technologie wird benutzt, um Zellen, die einen bestimmten Oberflächenmarker exprimieren, aus einem Zellpool zu isolieren. Dafür werden die spezifischen Antikörper mit Magnetpartikeln konjugiert. Die Konjugate binden an den Oberflächenmarker. Danach können die vom Antikörper erkannten Zellen mit Hilfe eines Magneten separiert werden.

2.1.6.1 Magnetpartikel (*MicroBeads*)

Die *MicroBeads* (*Mouse anti-human IgG MicroBeads*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) waren mit affinitätsgereinigten monoklonalen Anti-CD34-Antikörpern der Maus (QBEND/10) konjugiert und dienten zur direkten Separierung CD34-exprimierender hämatopoietischer Vorläuferzellen.

2.1.6.2 Magnetischer Zell-Separator

Bei dem verwendeten MidiMACS-Separator (MACS -Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) handelt es sich um einen starken Permanentmagneten, der an der MACS-Multi-Stand-Station befestigt wird und als Halterung für die entsprechenden MACS-Säulen dient.

2.1.6.3 Separationssäulen

Die Matrix der *large scale* (LS)-Säulen (LS Columns, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) ist hydrophob und dient der positiven Selektion von *MicroBead*-gebundenen Zellen.

2.1.7 Oligonukleotide

JAK2 V617F Primer für konventionelle PCR	
Vorwärts-Primer	5' tgc tga aag tag gag aaa gtg cat 3'
Rückwärts-Primer	5' tcc tac agt gtt ttc agt ttc aa 3'
JAK2 V617F Primer für cDNA	
Vorwärts-Primer	5' ggc gta cga aga gaa gta gga gac 3'
Rückwärts-Primer	5' tgc atg gcc cat gcc 3'
JAK2 V617F Primer und Sonden für <i>real-time</i> PCR nach McClure et al., 2006	
Vorwärts-Primer	5' aag cag caa gta tga tga g 3'
Rückwärts-Primer	5' cct agc tgt gat cct gaa 3'
Sensor-Sonde	5' atg tgt ctg tgg aga cga gag-fluorescein 3'
Anker-Sonde	5' red640- aag taa aac tac agg ctt tct aat gcc ttt ct 3'
JAK2 V617F Primer und Sonden für <i>real-time</i> PCR nach Olsen et al., 2006	
Vorwärts-Primer	5' aag cag caa gta tga tga gca a 3'
Rückwärts-Primer	5' agc tgt gat cct gaa act gaa 3'
Sensor-Sonde	5' gta gtt tta ctt act ctc gtc tc--fluorescein 3'
Anker-Sonde	5' red640 cag aca cat act cca taa ttt-PH 3'
MPL W515L Primer und Sonden nach Pardanani et al. 2006	
Vorwärts-Primer	5' tgg gcc gaa gtc tga ccc ttt 3'
Rückwärts-Primer	5' aca gag cga acc aag aat gcc tgt 3'
Sensor-Sonde	5' ctg cca cct cag cag ca red-640 3'
Anker-Sonde	5' ggt gac cgc tct gca tct agt gct 3'
MPL W515L Sequenzierprimer	
Vorwärts-Primer	5' ggt gac cgc tct gca tct agt gct 3'
Rückwärts-Primer	5' cac ctg gtc cac cgc cag tct 3'

2.1.8 Geräte und Plastikmaterial

Die Hersteller der verwendeten Geräte und Plastikmaterialien sind, wenn nicht im Folgenden aufgeführt, an den entsprechenden Stellen im Text erwähnt.

Autoklav	Tuttnauer Systec 3870 EL
Filter	Corning (Bottle-Top-Filter 0,22µm)
Gel-Photodokumentation	GelDoc 2000 BioRAD
Gelsysteme	Pharmacia Biotech
Heizblock	Eppendorf
Mikroskope	Zeiss Axioplan 2 imaging+ Axiocam HRc sowie Leica DMIRB+ Thermocontrol 37-2 digital + CTI-Controller 3700 digital + Axiocam HRc Leica DMIL
Nano Drop	Peqlab Erlangen
Pipetten	Corning (Stripette 5-25 ml)
Sterilbank	Gelaine BSB 4A Clean Air NSF 49 BS 5749
Waage	Chyo MP300
Zellkulturflaschen und Platten	Greiner bio-one
Zentrifugen	Hettich: Universal 30 RF; Rotixa/P Eppendorf Tischzentrifuge

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 DNA-Isolierung

DNA aus den verschiedenen Proben (KM, PB) wurde mittels QIAamp Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Empfehlungen des Herstellers isoliert. Die DNA-Isolierung von Objektträgern erbrachte teilweise sehr geringe DNA-Konzentrationen (<5 ng/µl), so dass in der konventionellen PCR kein Amplifikat gebildet werden konnte siehe 2.2.1.2.

2.2.1.2 DNA-Einengung

Die Proben 701, 702, 703, 705, 706, 707, 709, 710 und 157 wurden mit Ethanol und Natriumacetat gefällt. Dazu wurde zur DNA-Suspension ein Zehntel des Volumens 3M Natriumacetat und das dreifache Volumen 100% Ethanol (p.a.) gegeben. Dieses Gemisch wurde 30 Min. bei -80°C und 2 h bei -20°C eingefroren, danach bei 4°C unter 13000g in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurde das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und erneut wie oben 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert. Nach 10-minütigem Trocknen des Sediments im geöffneten Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) wurde dieses in 10 µl AE-Puffer (10 mM Tris Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9.0; Qiagen, Hilden) gelöst.

Die Proben 704 und 708 wurden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingeeengt. Nach Aliquotierung der Proben wurden diese 30 Min. zentrifugiert, um die nötige Dauer der Zentrifugation zu minimieren; anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet. Das Sediment wurde in AE-Puffer gelöst.

2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgte mit einem UV/Vis Spektralphotometer (NanoDrop, Peqlab, Erlangen). Hierbei wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm für DNA gegen AE-Puffer als Leerwert gemessen. Für diese Bestimmung wurde ein Mikroliter der Probe auf das Ende einer optischen Faser („receiving fiber“) pipettiert. Anschließend wurde eine weitere optische Faser („source fiber“) mit der Probe in Kontakt gebracht.

Der Lichtweg betrug 1,0 mm. Der Reinheitsgrad der Lösung wurde durch den Extinktionskoeffizient A_{260}/A_{280} abgeschätzt. Eine DNA-Lösung wurde als „rein“ bezeichnet, wenn ihr Extinktionskoeffizient über 1,8 lag.

2.2.3 Synthese von cDNA

Zunächst wurden 1 μ l 50 μ M Oligo(dT)₂₀ Primer, 2 μ l 10 mM dNTP Mix und 9 μ l RNA gemischt und für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Primer und Sekundärstrukturen der RNA denaturiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt. Zu der vorbereiteten RNA-Probe wurden 8 μ l Mastermix (4 μ l 5x cDNA Synthese Puffer; 1 μ l 0,1 M DTT; 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l); 1 μ l DEPC-H₂O; 1 μ l ThermoScriptRT(15U/ μ l)) gegeben. Die nachfolgende Inkubation bei 55°C dauerte eine Stunde. Diese Reaktion wurde durch eine fünfminütige Inkubation bei 85°C terminiert. Zuletzt wurde die Probe mit 1 μ l RNaseH für 20 Min. bei 37°C inkubiert, um die komplementäre RNA zu entfernen (ThermoScript Reverse Transkription-PCR System, Invitrogen, Karlsruhe). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Für die Reaktionen wurden die Thermocycler von Biometra (T3 Thermocycler), Eppendorf (Mastercycler Personal) und Applied Biosystems (GeneAmp PCR System 9600) verwendet.

2.2.4.1 Amplifikation durch konventionelle PCR

Ein Abschnitt des JAK2-Gens wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Die Primer waren HPLC-gereinigt und wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin) bezogen. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 20 µl in einem Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) ausgeführt. Darin enthalten waren je nach DNA-Konzentration 3 oder 8 µl DNA bzw. PCR-Produkt, 10 pmol eines jeden Primers, je 10 mM dNTP (AppliedBiosystems.), 10x *High Fidelity* Puffer (Eppendorf, Hamburg) und 2,5 U DNA Polymerase (Eppendorf, Hamburg). Die PCR begann mit einer 2-minütigen Präinkubation bei 94°C. Jeder der folgenden 31 Zyklen bestand aus 20 Sek. Denaturierung bei 94°C, 20 Sek. Primer-Hybridisierung bei 52°C und 20 Sek. Elongation bei 72°C. Anschließend wurde die Temperatur für 2 Min. bei 74°C gehalten. Jede Amplifikation beinhaltete mindestens einen Reaktionsansatz ohne DNA als Null-Kontrolle.

2.2.4.2 Amplifikation durch *real-time* PCR und Schmelzkurvenanalyse

Mit Hilfe der *real-time* PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse ist es möglich, mit nur einem Gerät DNA zu amplifizieren und eine quantitative Aussage über den Anteil eines mutierten Allels zu treffen. Dazu wurden die Kits *LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit* und *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* von Roche (Mannheim) benutzt.

2.2.4.2.1 JAK2 V617F

Es kamen unterschiedliche Sonden und Primer zum Einsatz (zur Etablierung siehe Ergebnisteil). Die Mutationsanalyse wurde dann mit Primern und Sonden nach Olsen *et al.* (2006) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 20 µl in einem Roche LC durchgeführt. Darin enthalten waren 5 µl DNA, 4 µl FAST START *ready to use reaction mix* (5x, Roche) sowie 3 mM Magnesiumchlorid. Primer und Sonden (TibMolbiol, Berlin) waren 0,5 mM im finalen Volumen enthalten. Der Reaktionsablauf war folgendermaßen: Die anfängliche Denaturierung erfolgte über 10 Min. bei 95°C, die 55 PCR-Zyklen bestanden jeweils aus 10 Sek. Denaturierung bei 95°C, 1 Min. Primer-Hybridisierung bei 65°C und 10 Sek. Elongation bei 72°C.

Die Schmelzkurve bestand aus 10 Sek. Denaturierung bei 95°C, die Paarung von Sonden und PCR-Produkt erfolgte bei 37°C für eine Minute, danach wurde die Temperatur kontinuierlich um 0,2°C/Sek. auf 70°C erhöht, dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

2.2.4.2.2 MPL W515L

Ein Ausschnitt aus dem TPOR-Gen wurde mittels der *real-time*-PCR vervielfältigt, wie bereits beschrieben (Pardanani *et al.*, 2006). Die Primer waren HPSF-gereinigt und wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin) bezogen. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 20 µl in einem Light Cycler (Roche, Mannheim) ausgeführt. Darin enthalten waren 2 µl DNA, 2 µl *FAST START ready to use reaction mix* (5x Roche, Mannheim) sowie 3 mM Magnesiumchlorid (diese Konzentration wurde von mir austitriert). Primer und Sonden (TibMolbiol, Berlin) waren 0,5 mM im finalen Volumen enthalten. Die anfängliche Denaturierung erfolgte über 10 Min. bei 95°C, die 40 PCR-Zyklen enthielten jeweils 10 Sek. Denaturierung bei 95°C, 10 Sek. Primer-Hybridisierung bei 57°C und 15 Sek. Elongation bei 72°C. Die Schmelzkurve bestand aus initialer Denaturierung bei 95°C, die Paarung von Sonden und PCR-Produkt erfolgte bei 45°C für 30 Sek., danach wurde die Temperatur kontinuierlich um 0,2°C/Sek. auf 85°C erhöht, dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Die Sonden entsprachen der Wildtypsequenz. Wenn die gesuchte Mutation vorhanden ist, entsteht eine Fehlpaarung, so dass das Hybrid aus Sonde und mutierter DNA bereits bei ca. 52°C schmilzt; das Wildtyp-Hybrid schmilzt erst bei 63°C.

2.2.5 Gel-Elektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte

Jeweils 10 µl PCR-Produkt wurde bei einer konstanten Spannung von 95 V für 90 min in Agarosegel, je nach Produktlänge 1,5%- oder 3%ig, unter TAE-Puffer aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (245 nm) durch Vergleich mit den oben beschriebenen Größenstandards. Anschließend wurde das Produkt mit einem kommerziellen Kit (*Wizard PCR Preps DNA Purification System*, Promega, Heidelberg) aufgereinigt, um Primer, Primer-Dimere, DNA-Polymerase, dNTPs und andere Bestandteile der PCR zu entfernen; dabei wurde gleichzeitig die DNA zweifach konzentriert.

2.2.5.1 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde mit dem *QIAQuick Gel Extraktion* Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Je 5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurde mit jeweils 20 pmol Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer versetzt und zur Auftragssequenzierung zu SeqLab, Göttingen gegeben.

2.2.7 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.7.1 Separierung mononukleärer Zellen mittels Dichtezentrifugation

Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden mittels Dichtezentrifugation aus aspiriertem Knochenmark separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte verschiedener Blut- bzw. Knochenmarkszellen zunutze. Nach dem Überschichten des Knochenmarks auf eine hochmolekulare Flüssigkeit werden die mononukleären Zellen durch Zentrifugation von Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Zunächst wurde das Knochenmarkspirat durch ein Nygonsieb gefiltert und mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Das verdünnte KM wurde in einem 50 ml-Röhrchen vorsichtig, ohne Vermischung der beiden Phasen, auf eine 15 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1.077) (Biocoll, Biochrom, Berlin) geschichtet. Nach Zentrifugation unter Raumtemperatur bei 900 g (ohne Bremse am Ende der Zentrifugation) war in den 50 ml-Röhrchen eine deutliche Phasentrennung zu erkennen.

In der untersten Phase befanden sich die Erythrozyten und Granulozyten, gefolgt von der Ficoll-Lösung und einer dünnen weißen Schicht von MNZ (*Buffy Coat*). Die oberste Phase bestand aus Serum. Die MNZ-Schicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 600 g 7 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zur Lyse verbliebener Erythrozyten in 20 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und für 7 Min. bei 4°C inkubiert. Bei MDS-Patienten wurde keine Lyse durchgeführt, um die empfindlichen Erythroblasten nicht zu zerstören. Anschließend wurde das Volumen mit MACS-Puffer auf 50 ml vergrößert und die Zellen erneut pelletiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit MACS-Puffer.

Vor der Zentrifugation wurden 500 μl der Zellsuspension für die Zellzählung und weitere 100 μl pro durchflusszytometrische Messung abgenommen. Das Pellet wurde in 0,5-1 ml MACS-Puffer aufgenommen und kalt gestellt. Die MNZ wurden gezählt und die Konzentration der CD34^+ -Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (s.u.).

2.2.7.2 Anreicherung von CD34^+ -Zellen

Die aus dem Knochenmark separierten, pelletierten mononukleären Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zunächst mit 100 μl FcR-Blocking-Reagenz (*CD34 Progenitor Cell Isolation Kit*; Miltenyi) pro 1×10^8 Zellen versetzt, sorgfältig gemischt und eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert, um eine unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Bindung der *MicroBeads* zu inhibieren. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C für 30 Min. mit 100 μl Anti- CD34 -Beads (*CD34 Progenitor Cell Isolation Kit*; Miltenyi) pro 1×10^8 Zellen inkubiert und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1-2 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Die Zellen wurden über einen Zellfilter (*pre-separation filter*; Miltenyi) auf die Separationssäule im Magneten gegeben, die vorher mit einem Säulenvolumen MACS-Puffer äquilibriert worden war. Nachdem die CD34^+ -Zellen über die magnetischen Beads an die Säule retardiert worden waren, wurde diese dreimal mit jeweils 7 ml MACS-Puffer gespült, um alle nicht retardierten Zellen von der Säule zu spülen. Der gesamte Durchfluss der Säule im Magnetfeld wurde als CD34 -negative (CD34^-) Zellfraktion in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt und 100 μl pro FACS-Messung abgenommen. Die Säule wurde nun aus dem Magnetfeld entfernt. Damit wurden die *MicroBeads* mit den gebundenen Zellen von der Säulenmatrix freigesetzt und konnten mit 2×7 ml MACS-Puffer durch Druck mit einem Stempel in ein 15 ml-Röhrchen eluiert werden. Um die Reinheit der Zellpopulation zu erhöhen, konnte die eluierte Zellfraktion erneut über eine zweite Säule getrennt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl und des CD34 -Gehaltes wurden 500 μl der Zellsuspension für die Zellzählung und weitere 100 μl pro durchflusszytometrischer Messung abgenommen.

2.2.7.3 Zellzahlbestimmung

Für eine automatisierte Messung wurden 300 µl Zellsuspension benötigt, die nach dem Ansaugen im Gerät verdünnt wurden (CellDyn 3500R Abbott Wiesbaden). Da die Widerstandsänderung proportional zum Zellvolumen ist, erfolgte die Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen anhand der Widerstandsänderungen, die beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare auftraten. Bevor die verdünnte Probe mit Lysisreagenz versetzt wurde, wurde die Erythrozyten- und die Thrombozytenkonzentration gemessen. Anschließend wurde in der lysierten Probe die Leukozytenzahl ermittelt. Diese setzt sich aus der Anzahl von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zusammen. Die Zuordnung der Zellen geschieht über deren Größe und Granularität. Alternativ wurde die Zellzahl nach Anfärben der Zellsuspension mit Trypanblau manuell mit Hilfe der Neubauerkammer bestimmt.

2.2.7.4 Kultivierungsbedingungen

Die CD34⁺-Zellen wurden zur Untersuchung von Zellpolarität und Motilität drei Tage in I20⁺⁺⁺-Medium in 24-Well-Platten (ca. 80.000 Zellen pro Well) kultiviert. Die Temperatur im Brutschrank betrug 37°C und die CO₂-Konzentration 5%. Für die Zeitreihen am Durchflusszytometer wurden die Zellen unter denselben Bedingungen 7d kultiviert. MNZ aus jeder Patienten-Probe wurden in I20 in einer 6-Well-Platte für die Kompensationsmessungen am Durchflusszytometer ebenfalls kultiviert.

2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

Die Methode der Durchflusszytometrie wird zur Zählung und zur Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen wie Oberflächenmarker in einem Flüssigkeitsstrom verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse ist ein Verfahren, das auf Fluoreszenz induzierter Streuung von Licht aufgrund physikalischer Brechungseigenschaften einer Zelle basiert. Die Lichtstreuung des Laserstrahls gibt hierbei Aufschluss über Größe und Granularität, denn je größer eine Zelle ist und je mehr Organellen in ihrem Inneren sind, desto stärker wird der auf die Zelle treffende Laserstrahl gestreut.

Informationen über die Zellgröße erhält man durch das Vorwärtsstreulicht (*Forward-Scatter*; FSC), das in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls gemessen wird. Das Seitwärtsstreulicht (*Side-Scatter*; SSC) wird etwa rechtwinkelig zum Laserstrahl detektiert, es liefert Informationen über die Granularität der Zellen. Neben Zellgröße und -granularität lässt sich mit Hilfe des Durchflusszytometers die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen auf oder innerhalb der Zellen quantitativ bestimmen. Grundlage für diese durchflusszytometrische Analyse bildet die Antigen-Antikörper-Bindung. Dabei werden die von der Zelle exprimierten Antigene mit Hilfe von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert. Die gefärbten Zellen werden in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinander gereiht und an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet, der die Fluorochrome der an die Zellen gebundenen Antikörper, anregt. Mit Photodetektoren wird das emittierte Fluoreszenzsignal einer Zelle registriert, dessen Intensität proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und damit auch zur Menge des exprimierten Proteins ist. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht es, in einer Messung die Expression verschiedener Proteine gleichzeitig zu analysieren. Für diese Arbeit wurden bis zu drei Proteine mit Hilfe von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig gemessen. Mit Hilfe einer Darstellungs- und Auswertungssoftware für durchflusszytometrische Analysen können die physikalischen Ereignisse in durchflusszytometrischen Diagrammen (Dot-Plot) dargestellt werden. In diesen Diagrammen werden die Zellen, die ähnliche Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften haben, in wolkenähnlichen Projektionen dargestellt. In diesen Abbildungen entspricht jeder Punkt einem gemessenen Ereignis also einer Zelle, mit entsprechenden fluoreszierenden Eigenschaften. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen wird in der Regel nur ein Teil der Messereignisse herangezogen. Um eine Auswahl bestimmter Zellen bezüglich ihrer Fluoreszenz-Eigenschaften zu treffen, werden mithilfe der Software Teilmengen definiert, welche sich nun auch bezüglich weiterer Parameter in neuen Diagrammen darstellen lassen. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgen mit der Cytomics RXP-Software an einem Cytomics FC500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Krefeld).

2.2.9 Lebendfärbungen

Lebendfärbungen wurden, während die Zellen in Kultivierungsbedingungen verweilten, durchgeführt.

2.2.9.1 Lebendfärbung mit dem Mitotracker

Der Mitotracker CMXRos oder FMGreen wird der Zellsuspension in der oben genannten Verdünnung zugeführt und die Zellen werden für 2 h im Brutschrank inkubiert.

Für die Zeitreihen am Durchflusszytometer wurden pro *Well* 50.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden jeweils am Tag der Färbung erneut gezählt.

2.2.10 Immunhistochemische Analysen

2.2.10.1 Färbungen in Suspension

Die geernteten Zellen werden im Medium in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) über 20 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Falls das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, fixierungssensitiv ist, d.h. modifiziert werden könnte, erfolgte zunächst eine Vorfixierung mit 0,2%igem PFA für 5 Min. bei Raumtemperatur. Die Fixierung der Zellen ist wichtig für Lokalisationsstudien sowie um die Morphologie der Zellen zu konservieren. Soll an dieser Stelle ein extrazelluläres Epitop angefärbt werden, erfolgt nun die Inkubation des ersten primären und anschließend des ersten sekundären Antikörpers (s.u.). Anschließend wird die Zelle mit Permeabilisierungspuffer (s.o.) für 30 Min. bei Raumtemperatur auf dem Taumler permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung erfolgt die Färbung von intrazellulären Proteinen.

2.2.10.2 Färbungen auf Adhäsionsobjektträgern

Die geernteten Zellen werden im Medium im 15 ml Röhrchen in 1% Paraformaldehyd (PFA) für 5 Min. bei Raumtemperatur vorfixiert, anschließend wird die Zelllösung auf 15 ml aufgefüllt und pelletiert. Die Zellen werden resuspendiert und auf Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, HistoBond, silanisierte Objektträger; Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgetropft (40.000 Zellen pro Tropfen; bis 8 Tropfen pro Objektträger). Nach ca. 10 Min. sind alle Zellen abgesunken und der Objektträger wird bei -22°C für 5 Min. in eine Küvette eiskaltes Methanol getaucht.

Anschließend sind die Zellen sowohl fixiert als auch permeabilisiert. Um die Zelltröpfchen wird nun eine Barriere mit einem Ölstift gezogen, damit die später aufgetragene AK-Lösung sich nicht über den kompletten Objektträger verteilt. Jetzt kann die Färbung von intrazellulären Proteinen in einer Feuchtigkeitskammer (MIST, *magnetic immuno staining tray*, CellPaths, Herts, UK) erfolgen.

Für die Waschschrte werden die Objektträger in eine mit PBS gefüllte Glasküvette gestellt und für 25 Min. auf dem Taumler inkubiert.

2.2.10.3 Extrazelluläre Färbungen

Sämtliche Inkubationsschritte mit Antikörpern erfolgen soweit nicht anders beschrieben für 30 Min. bei 4°C und in Anwesenheit von 5% Eseserum. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 600 g für 8 Min. bei Raumtemperatur soweit nicht anders erwähnt.

2.2.10.3.1 Färbung mit einem unkonjugierten Primärantikörper

Nach der Fixierung erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper in einem Volumen von 100-200 µl. Zum Entfernen von überschüssigen nicht gebundenen Antikörpermolekülen wird das Röhrchen mit Isoton auf 12 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf etwa 200 µl abgenommen und das Pellet in dem Restvolumen resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschschrten wie oben beschrieben erfolgt das Nachfärben des Primärantikörpers mit einem fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper. Da die Fluorochrome PE und FITC einem starken *Photobleaching*-Effekt unterliegen, sind die Sekundärantikörper mit einem stabileren Fluorochrom wie z.B. Cy3 oder Alexa488 gekoppelt und somit besser für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet. Nach zwei weiteren Waschschrten mit 0,01% TritonX100 zum Entfernen überschüssiger Antikörpermoleküle können die Zellen auf Objektträger getropft und nach dem Eintrocknen mit Eindeckelmedium und einem Deckgläschen versehen werden.

2.2.10.3.2. Doppelfärbung mit zwei Primärantikörpern aus einer Spezies

Wurden die für die Färbung verwendeten Antikörper aus Versuchstieren der gleichen Spezies gewonnen, kann die Inkubation der primären bzw. sekundären Antikörper nicht in einem Schritt erfolgen, da es sonst zu Kreuzreaktionen kommt. Die Färbungen müssen nacheinander erfolgen. Nach der Inkubation mit dem ersten verwendeten Primärantikörper erfolgt das Nachfärben mit fluorchrom-konjugierten Fab-Fragmenten, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind. Nachdem die überschüssigen Fab-Fragmente durch Waschen entfernt wurden, erfolgt ein Inkubationsschritt mit unkonjugierten Fab-Fragmenten, die alle restlichen unbesetzten Bindestellen am Fc-Teil des Primärantikörpers besetzen. Diese Färbestrategie mit Fab-Fragmenten wird verfolgt, da entsprechende Epitope des ersten verwendeten Primärantikörpers durch die Fab-Fragmente abgesättigt werden und somit nicht mehr von einem weiteren Sekundärantikörper erkannt werden können. Zum anderen hat die Verwendung von Fab-Fragmenten den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu kompletten Sekundärantikörpern, bestehend aus einem Fc- und zwei Fab-Fragmenten, nur eine Bindungswalenz besitzen und so verhindert wird, dass die zweite Bindungswalenz eines vollständigen Sekundärantikörpers den zweiten verwendeten Primärantikörper bindet und so Kreuzreaktionen hervorruft. Somit ist eine Doppelfärbung mit zwei Antikörpern, die aus der gleichen Spezies gewonnen wurden, möglich.

Durch Waschen werden die unkonjugierten Fab-Fragmente entfernt, und die Zellen können nun mit dem zweiten primären Antikörper inkubiert werden. Das Nachfärben kann an dieser Stelle mit einem fluorchrom-konjugierten Sekundär-Antikörper erfolgen.

2.2.10.4 Intrazelluläre Färbung

Nachdem die Zellen fixiert und permeabilisiert sind, erfolgen sämtliche Inkubationsschritte mit Antikörpern für die intrazelluläre Markierung soweit nicht anders beschrieben für mindestens 30 Min. auf dem Taumler und in Anwesenheit von 5% Eserserum. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 900 g über 10 Min. bei Raumtemperatur soweit nicht anders erwähnt. Die Färbestrategie ist dieselbe wie oben für extrazelluläre Färbungen beschrieben. Die Antikörper werden ggf. in geringeren Konzentrationen eingesetzt.

2.3.1 Analyse von Komorbiditäten

2.3.1.1 Patienten

Für die Auswertung von Komorbiditäten wurden Patienten herangezogen, die im Düsseldorfer MDS-Register dokumentiert sind und für die zum Zeitpunkt der Diagnose der IPSS-Score festgelegt wurde. Die Komorbiditäten wurden retrospektiv aus den Akten ermittelt. *Follow-up* Daten wurden in der hämatologischen Ambulanz der Uniklinik Düsseldorf oder durch Kontaktaufnahme mit dem Hausarzt erhoben. In die Analyse wurden nur Patienten eingeschlossen, die lediglich *Best Supportive Care* erhalten hatten; intensive Chemotherapie war ein Ausschlusskriterium. Als *Best Supportive-Care* galt die Transfusionsbehandlung mit Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten, die Gabe von Erythropoietin und die Behandlung mit Antibiotika.

2.3.1.2 Datenanalyse

Für deskriptive Analysen sowie uni- und multivariate Analysen wurde eine computergestützte Auswertung mit Hilfe von SPSS durchgeführt.

Endpunkte in der Analyse von Überlebenskurven war der Tod der Patienten. In den Niedrigrisikogruppen wurde der Endpunkt nur bei ca 30% der Patienten erreicht.

2.3.1.3 Nicht-leukämische Todesursache

Als nicht-leukämische Todesursache galt das Versterben eines Patienten aufgrund einer anderen Ursache als der Leukämie.

III Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Mutationen JAK2 V617F und MPL W515L/K, die bei Myeloproliferativen Syndromen einen Proliferationsvorteil induzieren, auch bei Myelodysplastischen Syndromen vorkommen.

Außerdem sollte die intrazelluläre Verteilung von Mortalin, das potentiell bei Myelodysplastischen Syndromen Dysplasie induziert, in CD34⁺-Zellen untersucht werden.

Weiterhin wurden Komorbiditäten bei MDS-Patienten in Bezug auf Häufigkeit und prognostische Relevanz untersucht.

3.1 Mutationsanalysen

3.1.1 DNA-Isolierung, konventionelle PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung von JAK2 V617F

Zur Analyse der JAK2-Mutation wurde zunächst die DNA isoliert, mittels PCR amplifiziert und nach der Kontrolle der PCR durch Gelelektrophorese, wurde das PCR-Produkt sequenziert.

Abbildung 3.1 zeigt die PCR-Produkte in einem Agarose-Gel. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden mittels eines kommerziellen *Kits* (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega, Heidelberg) aufgereinigt und zur Sequenzierung zu SeqLab nach Göttingen verschickt.



Abbildung 3.1: 3%iges Agarose-Gel

Die Größe des PCR-Produktes betrug 345bp. Bei den unteren Banden handelt es sich um Primer. Der DNA Größenmarker ist eine 100bp-Leiter. Die Bande, die 500bp entspricht, ist markiert. * enthält die PCR-Negativkontrolle.

Bei einigen PCR konnten in der Gel-Elektrophorese Banden bei ca. 200, 400 und 500 bp dargestellt werden (Abb. 3.2). Diese wurden mit Hilfe des *QIAQuick Gel Extraktion Kits* extrahiert und sequenziert. Es handelte sich um längere bzw. kürzere Sequenzen aus dem JAK2-Gen, die aufgrund des Einsatzes des PCR-Produktes in eine erneute PCR ebenfalls amplifiziert wurden.



Abbildung 3.2: 3%iges Agarose Gel

Die Größe des PCR-Produktes betrug 345bp. Bei den unteren Banden handelt es sich um Primer. Der DNA Größenmarker ist eine 100bp-Leiter. Die Bande, die 500bp entspricht, ist markiert. * enthält die PCR-Negativkontrolle. Einzelne Banden bei ca. 200, 400 und 500bp wurden ausgeschnitten und sequenziert.

In Tabelle 3.1 werden die Ergebnisse der Sequenzierung bezüglich JAK2 V617F gezeigt.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Sequenzierung

Wt=Wildtyp, die Prozentzahlen stehen für den Anteil des mutierten Alleles;

Proben Nr.	JAK2 V617F	Proben Nr.	JAK2 V617F	Proben Nr.	JAK2 V617F	Proben Nr.	JAK2 V617F
114	Wt	582	Wt	714	Wt	808	Wt
157	Wt	610	Wt	715	Wt	810	Wt
205	Wt	624	Wt	716	Wt	811	Wt
213	Wt	655	Wt	717	Wt	812	Wt
221	Wt	656	Wt	718	Wt	813	Wt
223	Wt	672	Wt	719	ca .30%	814	Wt
232	Wt	701	Wt	720	Wt	815	Wt
277	Wt	702	Wt	721	Wt	840	ca. 60%
298	Wt	703	Wt	722	Wt	841	ca. 30%
336	Wt	704	n.d.	723	Wt	842	ca. 30%
355	Wt	705	Wt	724	Wt	843	ca. 45%
421	Wt	706	Wt	725	Wt	844	ca. 15%
427	Wt	707	Wt	726	Wt	845	Wt
432	Wt	708	Wt	802	Wt		
456	ca. 10%	709	Wt	803	Wt		
477	Wt	710/809	Wt	804	Wt		
497	Wt	711	ca.30%	805	Wt		
504	Wt	712/836	ca. 5%	806	Wt		
581	Wt	713	Wt	807	ca. 10%		

3.1.2 Etablierung der *real-time* PCR und der Schmelzkurvenanalyse für JAK2 V617F

Um den Schritt der Sequenzierung zu sparen und die Analyse zu beschleunigen, wurde eine *real-time* PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse etabliert.

Zunächst wurde die *real-time* PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse mit Primern und Sonden, wie bei McClure *et al.* (Leukemia, 2006) beschrieben, durchgeführt. Es ergaben sich jedoch in der Schmelzkurvenanalyse Kurven, die im Bereich des Wildtyppeaks 2 Höhepunkte (im folgenden Doppelpeaks genannt) hatten. Daraufhin wurde eine ausführliche Etablierung der Methode mit dem LightCyclerFastStart DNA Master SYBR Green I Kit durchgeführt. Trotz ausführlicher Etablierungsversuche konnte kein gutes Ergebnis erzielt werden.

Die Mutationsanalyse wurde dann mit Primern und Sonden nach Olsen *et al.* (Arch Pathol Lab Med, 2006) durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die Sonden entsprachen der Wildtypsequenz. Wenn die JAK2 V617F-Mutation vorhanden ist, entsteht eine Fehlpaarung mit der entsprechenden Sonde. Dementsprechend schmilzt das Hybrid aus Sonde und mutierter DNA bei ca. 48°C, das Hybrid aus Wildtyp und Sonde bei 58°C.

In der Sensitivitätsanalyse wurde festgestellt, dass weniger als 5% mutierte DNA in 95% Wildtyp-DNA nachzuweisen sind. Die PCR war in der Lage, eine 1/100.000 Verdünnung einer 3 ng/µl konzentrierten CMK-DNA zu amplifizieren. Abbildung 3.3 zeigt eine Beispiel-Schmelzkurve mit der Patientenprobe 836.

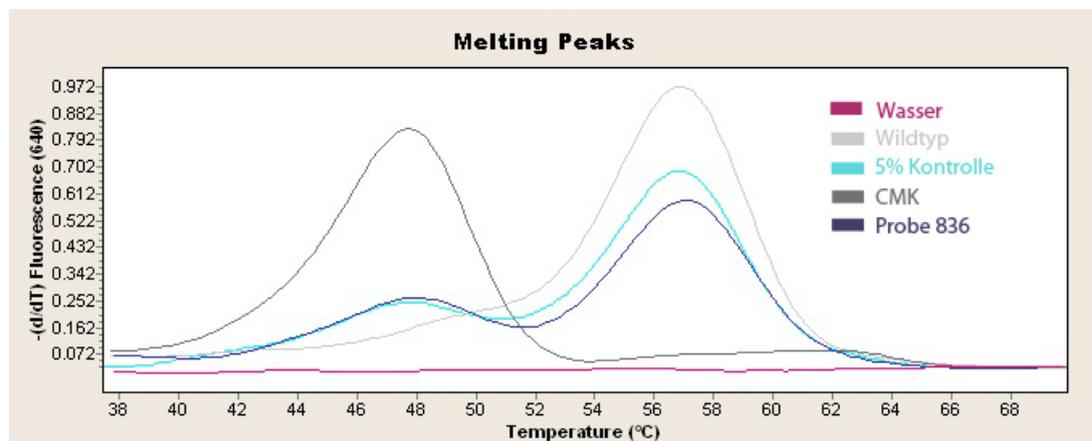


Abbildung 3.3 Schmelzkurvenanalyse für JAK2 V617F

Die CMK-DNA stammt aus einer Zelllinie, die die JAK2-Mutation exprimiert und dient als Positiv-Kontrolle. 5% Kontrolle heißt, in dieser Probe befinden sich 5% der CMK-DNA und 95% der Wildtyp-DNA.

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse entsprachen, sofern beide Methoden durchgeführt wurden, denen der Sequenzierung (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Ergebnisse von Sequenzierung (Seq) und Schmelzkurvenanalyse (LC)
 Wt=Wildtyp, die Prozentzahlen stehen für den Anteil des mutierten Alleles, n.d.=nicht durchgeführt

Nr.	Seq: JAK2V617F	LC JAK2V617F	Nr.	Seq: JAK2V617F	LC JAK2V617F	Nr.	Seq:JAK2V617F	LC JAK2V617F
114	Wt	n.d	582	Wt	n.d.	714	Wt	n.d.
157	Wt	n.d.	610	Wt	n.d.	715	Wt	n.d.
205	Wt	n.d.	624	Wt	n.d.	716	Wt	n.d.
213	Wt	n.d.	655	Wt	Wt	717	Wt	n.d.
221	Wt	Wt	656	Wt	Wt	718	Wt	n.d.
223	Wt	n.d.	672	Wt	n.d.	719	ca. 30%	n.d.
232	Wt	Wt	701	Wt	n.d.	720	Wt	n.d.
277	Wt	Wt	702	Wt	n.d.	721	Wt	n.d.
298	Wt	n.d.	703	Wt	n.d.	722	Wt	n.d.
336	Wt	Wt	704	n.d.	n.d.	723	Wt	n.d.
355	Wt	n.d.	705	Wt	n.d.	724	Wt	n.d.
421	Wt	n.d.	706	Wt	n.d.	725	Wt	n.d.
427	Wt	n.d.	707	Wt	n.d.	726	Wt	n.d.
432	Wt	Wt	708	Wt	n.d.	802	Wt	Wt
456	ca. 10%	ca. 10%	709	Wt	n.d.	803	Wt	Wt
477	Wt	n.d.	710	Wt	n.d.	804	Wt	Wt
497	Wt	n.d.	711	ca. 30%	n.d.	805	Wt	Wt
504	Wt	n.d.	712/836	ca. 5%	5%	806	Wt	Wt
581	Wt	n.d.	713	Wt	n.d.	807	ca. 10%	ca. 10%

3.1.3 Ergebnisse Mutationsanalyse JAK2 V617F

Die JAK2 V617F-Mutation konnte bei 6 von 12 RARS-T Patienten, aber bei keinem der 4 Patienten mit RARS und einer Thrombozytenzahl von 500.000 bis 600.000/ μ l nachgewiesen werden.

Tabelle 3.3: Klinische Merkmale und Ergebnisse der Mutationsanalyse der 12 Patienten mit RARS-T (Thrombozyten >600.000/ μ l) und der 4 Patienten mit RARS (Thrombozyten zwischen 500.000 and 600.000/ μ l) n.d. nicht durchgeführt, Thr.= Thrombozyten

Geschlecht/ Alter bei Dx	% Ringsidero- blasten bei Dx	Hb bei Dx g/dl	WBC bei Dx / μ l	Thr. bei Dx / μ l	Karyotyp	<i>follow up</i> <i>/outcome</i>	JAK2 V617F	MPL W515L/K
f/80	15	5,2	20.300	2.100.000	n.d.	1 m., verstorben	30%	wt
m/66	43	10,2	7.140	1.350.000	n.d.	59 m., verstorben	wt	wt
m/80	60	9,1	6.900	1.105.000	n.d.	16 m., verstorben	wt	wt
m/84	15	7,4	32.500	1.012.000	n.d.	1 m., lost	60%	wt
f/59	43	10,9	8.900	999.000	Normal	233 m., lebend	30%	wt
m/77	44	13,1	8.700	957.000	n.d.	23 m., lost	5%	wt
f/87	45	9,1	17.000	942.000	n.d.	5 m., verstorben	45%	wt
m/72	19	9,6	7.300	695.000	Normal	10 m., lebend	15%	wt
f/58	38	9,6	9.800	686.000	Normal	97 m., verstorben, AML	wt	wt
f/57	50	6,1	7.500	677.000	del 11	17 m., verstorben	wt	wt
f/63	57	7,3	2.900	664.000	Normal	12 m., lebend	wt	wt
f/80	18	8,9	9.000	642.000	n.d.	54 m., verstorben	wt	wt
f/82	29	11,9	5.300	589.000	n.d.	22 m., lebend	wt	wt
m/73	21	7,5	16.800	572.000	komplex	33 m., verstorben, AML	wt	wt
m/72	16	9,3	4.400	552.000	n.d.	33 m., lebend	wt	wt
f/74	30	8,0	3.500	542.000	n.d.	135 m., lebend	wt	wt

In anderen Subgruppen konnte die JAK2-Mutation sporadisch gefunden werden: bei 2 von 18 RA-Patienten (Thrombozytenzahl 999.000/ μ l bzw. 1.350.000 / μ l), bei 1 von 5 CMML-Patienten (Thrombozytenzahl 507.000/ μ l), bei keinem von 8 RAEB, bei 1 von 2 RAEB-T-Patienten (Thrombozytenzahl 967.000/ μ l) sowie bei 4 von 41 MDS-Patienten mit isolierter Del (5q).

3.1.4 MPL W515L/K *real-time* PCR und Schmelzkurvenanalyse

Die *real-time* PCR mit der oben beschriebenen Methode funktionierte gut (Abb. 3.4). Um die Kurven zu optimieren, wurde noch eine Magnesium-Titration durchgeführt. Optimale Ergebnisse wurden bei 3 mM Magnesium-Konzentration erreicht.

Als Positivkontrolle wurde die DNA eines ET-Patienten mit MPL W515L benutzt. Die MPL-Mutation wurde bei diesem Patienten auch durch Sequenzierung bestätigt. Die Negativkontrolle blieb negativ.

Es konnte bei keinem der Patienten mit Thrombozytose eine MPL W515L/K Mutation nachgewiesen werden (Tabelle 3.4). Von den 41 MDS- Patienten mit isolierter Del (5q) konnte ich für 13 Patienten die Analyse durchführen, von den übrigen Patienten war kein Material mehr vorhanden.

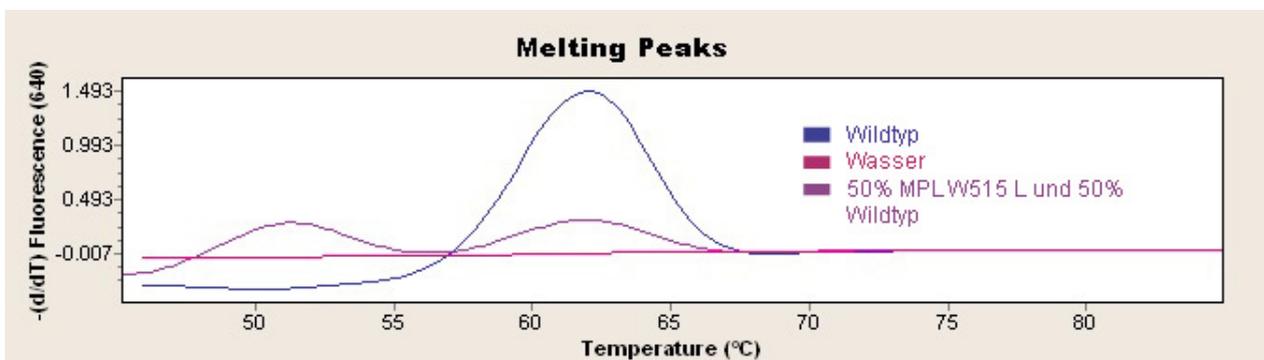


Abb.3.4: Schmelzkurven Analyse für MPL W515L/K

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse. Wt=Wildtyp.

Proben Nr.	MPL W515K/L						
114	Wt	624	Wt	818	Wt	837	Wt
205	Wt	655	Wt	819	Wt	840	Wt
213	Wt	656	Wt	820	Wt	841	Wt
221	Wt	672	Wt	821	Wt	842	Wt
223	Wt	802	Wt	822	Wt	843	Wt
232	Wt	803	Wt	823	Wt	844	Wt
277	Wt	804	Wt	824	Wt	845	Wt
298	Wt	805	Wt	825	Wt		
336	Wt	806	Wt	826	Wt		
355	Wt	807	Wt	827	Wt		
421	Wt	808	Wt	828	Wt		
427	Wt	810	Wt	829	Wt		
432	Wt	811	Wt	830	Wt		
477	Wt	812	Wt	831	Wt		
497	Wt	813	Wt	832	Wt		
504	Wt	814	Wt	833	Wt		
581	Wt	815	Wt	834	Wt		
582	Wt	816	Wt	835	Wt		
610	Wt	817	Wt	712/836	Wt		

3.1.5 Statistische Analysen

Statistische Analysen mit dem Statistikprogramm SPSS zeigten, dass RARS-T Patienten, die positiv für die JAK2 V617F Mutation sind, höhere Leukozytenzahlen (Median 15.800/ μ l versus 7.300/ μ l; $p=0.03$) sowie höhere Thrombozytenzahlen (Median, 1.118.000/ μ l versus 738.000/ μ l; $p=0.03$) zum Zeitpunkt der Diagnose aufweisen.

Weder die Konzentration der Thrombozyten noch der Leukozyten korrelierte mit dem Anteil des mutierten Alleles.

3.2 Analyse der intrazellulären Distribution von Mortalin

Um die intrazelluläre Verteilung von Mortalin im Zytoplasma von CD34⁺-Zellen von MDS-Patienten zu untersuchen, wurden aus deren Knochenmark zuerst die mononukleären Zellen mittels Ficoll aufgereinigt, anschließend die CD34⁺-Zellen mittels magnetischer Zellseparation angereichert. Die Verteilung von Mortalin im Zytoplasma von CD34⁺-Zellen von MDS-Patienten wurde verglichen mit der Verteilung in CD34⁺-Zellen aus Apheresat. Dazu wurden ebenfalls mittels magnetischer Zellseparation CD34⁺-Zellen angereichert. Alle CD34⁺-Zellen wurden dann in Kultur genommen und an Tag 3 der Kultivierung fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Der Anteil der CD34⁺-Zellen wurde in MNZ vor Aufreinigung gemessen, um die Anzahl der zu erwartenden Zellen berechnen zu können. Der Aufreinigungserfolg wurde ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt und an Tag 3 der Kultivierung erneut gemessen.

3.2.1 Zellzahlen und Aufreinigung von MDS-Knochenmark

Es wurden pro MDS-Patient 10 ml heparinisieretes KM aufgereinigt. Die Zellzahlen nach Ficoll - das heißt die absoluten MNZ - schwankten zwischen 6×10^6 und $2,7 \times 10^8$. Bei sehr geringen Zellzahlen und geringem Anteil CD34⁺-Zellen wurde teilweise auf eine Aufreinigung mit MACS verzichtet (Proben Nr. 0, 2 und 11). Die Proben 4 und 5 wurden für intrazelluläre Durchflusszytometrie verwendet. Gefärbt wurden MDS 1, 3, 6-10. Der Anteil der CD34⁺-Zellen betrug zwischen 0,2 und 14,9%. Die Reinheit nach MACS zwischen 57% und 93%. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: Charakteristika der MDS-KM; n.=nicht

Nr.	Geburtsdatum	Diagnose-datum	Diagnose initial	Diagnose bei Punktion	MNZ Zellzahl	CD34 vor MACS	CD34 nach MACS	CD34 d3
0	18.09.1932	14.06.2000	RAEB I	sAML	$6,1 \times 10^6$	0,2%		
1	07.05.1948	15.07.2003	RCMD	RCMD	$2,7 \times 10^8$	1%	77%	64,40%
2	02.10.1939	23.12.2005	RCMD	RAEBI	5×10^6	2%		
3	11.03.1937	15.06.2006	RAEB I	RAEBII	$4,8 \times 10^7$	10%	83,10%	77,30%
4	01.01.1948	15.07.2007		ICUS	$1,5 \times 10^7$	2,3%		
5	25.11.1933	17.06.2006	RCMD	RAEBII/sAML	6×10^6	10%		
6	12.05.1926	15.03.2004	unclass	sAML	2×10^7	14,9%	93,70%	92,60%
7	20.05.1947	07.04.2004	RCMD		1×10^7	3%	60,70%	60,20%
8	29.12.1943	06.03.2008	RCMD	Erstdiagnose	7×10^7	9%	67,80%	77,50%
9	11.05.1939	19.10.2005	RAEB I	sAML	3×10^7	15,8%	84,50%	83,3%
10	07.06.1983	06.06.2000	RCMD	RCMD	2×10^7	0,6%	57,60%	34,60%
11	07.05.1948	15.07.2003	n. auswertbar		$6,3 \times 10^6$	3%		

3.2.3 Zeitreihen im Durchflusszytometer

Um zu überprüfen, ob die Mitochondrien während der Mitose von CD34⁺-Zellen asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt werden, wurden erneut zunächst die CD34⁺-Zellen aus Apheresat isoliert und unter oben genannten Kulturbedingungen kultiviert.

Es wurden täglich mehrere *Wells* Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Mitotracker sowie Anti-CD34 Antikörper und Anti-CD133 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Bei einer asymmetrischen Verteilung der Mitochondrien würden mehrere Populationen erwartet, erstens die unreifen Zellen CD133^{high}, die wenig Mitochondrien erhalten würden, zweitens CD133^{low}, die reiferen Zellen, die theoretisch mehr Mitochondrien erhalten würden (Beckmann *et al.*, 2007). Abbildung 3.5 zeigt die Verteilung der Mitochondrien. Es konnte keine charakteristische Verteilung einer asymmetrischen Segregation der Mitochondrien gefunden werden.

In den Dot Plots, in denen der Mitotracker gegen CD34 aufgetragen ist, sieht man trotzdem jeweils rechts unten eine kleine Population CD133^{low} (hellgrau dargestellt), die weniger Mitotracker enthalten als die übrigen CD133^{intermediate} und CD133^{high} Zellen.

3.2.4 Quantitative Analyse von Mortalin im Durchflusszytometer

Um eine quantitative Aussage über Mortalin in CD34⁺-Zellen von MDS-Patienten im Vergleich zu CD34⁺-Zellen aus Apheresat zu treffen, wurde in MNZ Mortalin und CD34 angefärbt um durchflusszytometrisch die Menge von Mortalin zu bestimmen. Trotz Testung verschiedener Permeabilisierungsreagenzien, sowie CD34 Antikörper, die unterschiedliche Epitope erkennen, ging während der Permeabilisierung CD34 auf der Zelloberfläche verloren und es war somit nicht möglich, die CD34⁺-Zellen von den anderen MNZ zu unterscheiden um durchflusszytometrisch die Menge von Mortalin zu bestimmen.

Zeitreihe CD34+ Aph 10 MitoTracker

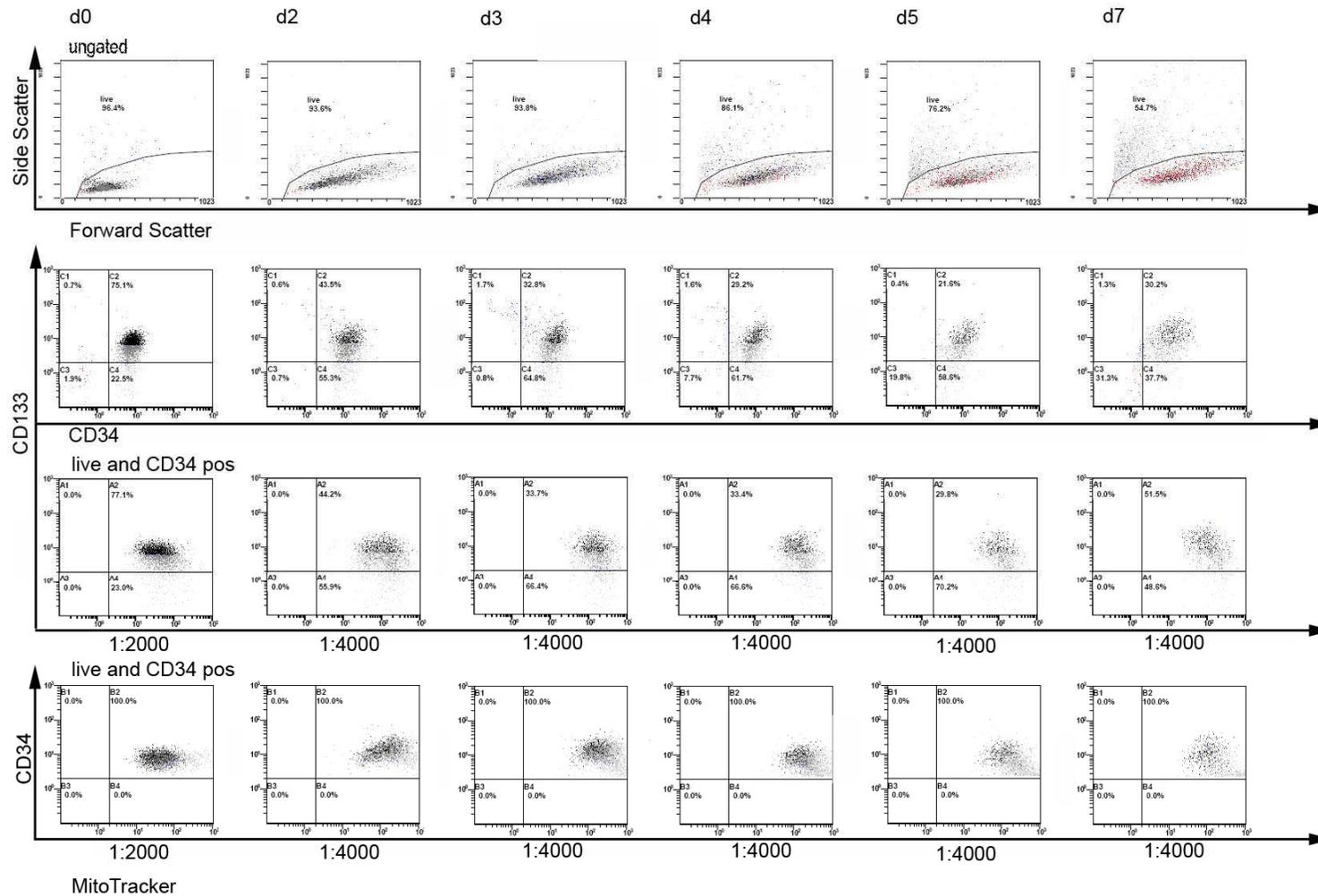


Abbildung 3.5: Tägliche Anfärbung der Mitochondrien sowie der CD133- und CD34-Proteine
 Zeile 1 *Forward/Side Scatter Dot Plots* , Zeile 2 *Dot Plots* der CD133/CD34-Messungen; Zeile 3 *gated* auf lebende und CD34⁺- Zellen *Dot plots* CD133/Mitotracker-Messungen und Zeile 4 *Dot Plots* der CD34/Mitotracker- Messungen. Zeile 3 und 4 1:2000 bzw. 1:4000 beschreibt die Verdünnung des Mitotracker.Hellgrau dargestellt CD133^{low}, Mittelgrau CD133^{intermediate} und schwarz CD133^{high}.

3.2.5 Mikroskopie

3.2.5.1 Polarität von CD34⁺-Zellen aus MDS-Knochenmark

Fuhler et al. beschrieben 2008, dass CD34⁺-Zellen aus MDS-Knochenmark im Vergleich zu CD34⁺-Zellen aus Knochenmark von hämatologisch gesunden Patienten eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit aufweisen u.a. aufgrund von beeinträchtigter F-Aktin Polymerisierung. Um festzustellen, ob CD34⁺-Zellen aus MDS-KM überhaupt in der Lage sind, einen Migrationsphänotypen - wie er für CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut typisch ist - anzunehmen, untersuchten wir zunächst mit Hilfe der Lichtmikroskopie die Polarität der CD34⁺-Zellen aus MDS-KM. Die CD34⁺-Zellen von MDS-Patienten nehmen unter den oben beschriebenen Bedingungen innerhalb weniger Minuten einen polarisierten Phänotyp an, ebenso wie für CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut beschrieben (Giebel *et al.*, 2004) (Abb. 3.6).

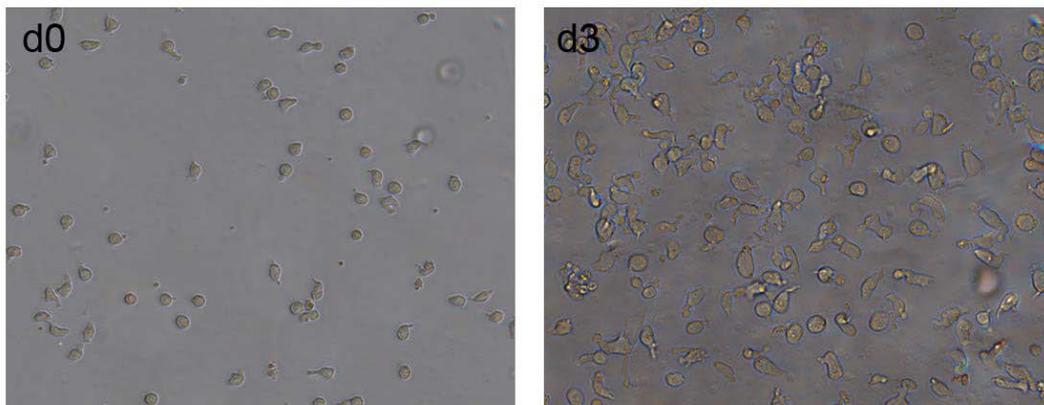


Abbildung 3.6: CD34⁺-Zellen im Durchlicht aus KM eines MDS-Patienten

Links an Tag 0 der Kultivierung: Die Zellen sind klein und rund. Rechts Tag 3 der Kultivierung: Die Zellen haben einen Migrationsphänotyp angenommen und sind gewachsen. d=Tag

3.2.5.2. Polarität von CD34⁺-Zellen aus Apheresat

Auch CD34⁺-Zellen aus Apheresat nehmen unter den oben beschriebenen Bedingungen innerhalb weniger Minuten einen polarisierten Phänotyp an (Abb. 3.7).

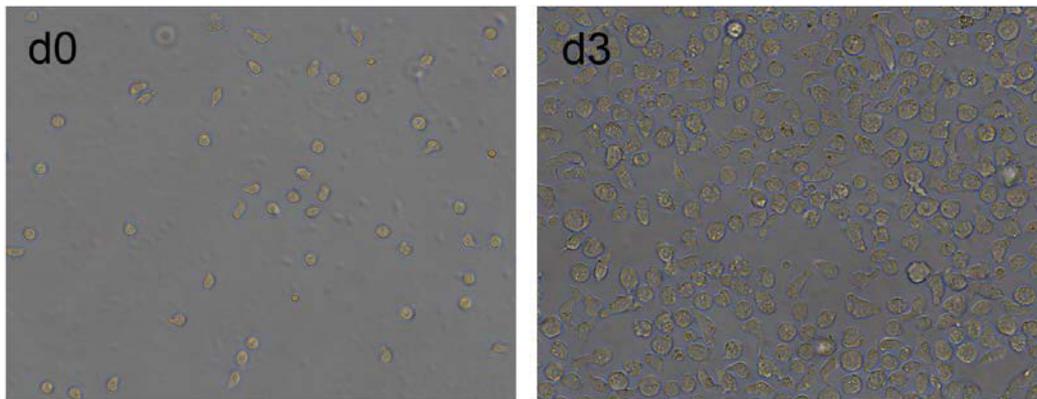


Abbildung 3.7: CD34⁺-Zellen im Durchlicht aus Apheresat.

Links an Tag 0 der Kultivierung: Die Zellen sind klein und rund. Rechts Tag 3 der Kultivierung: Die Zellen haben einen Migrationsphänotyp angenommen und sind gewachsen. d=Tag

3.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden grundsätzlich am 3. Tag der Kultivierung der CD34⁺-Zellen in I20⁺⁺⁺ durchgeführt.

Die intrazelluläre Färbung von Suspensionszellen wurde zunächst, wie bei Beckmann *et al.* (2007) beschrieben, durchgeführt (siehe auch Material und Methoden). Während der ersten Versuche klebten die Zellen zusammen. Um das zu verhindern, wurden verschiedene Waschpuffer ausprobiert. Als Grundlage wurde Isoton verwendet, es wurde verschieden-prozentig BSA, FBS und EDTA dazu gegeben. Das beste Ergebnis erzielte ein Waschpuffer mit 0,01% Triton und 10% FBS.

3.2.6.1 Mortalin als Mitochondrien-Marker

Zunächst sollte herausgefunden werden, ob Mortalin sich in CD34⁺-Zellen als Mitochondrien-Marker eignet, bzw. ob es in CD34⁺-Zellen extramitochondriale Lokalisationen von Mortalin - wie für andere Zellen beschrieben - gibt. Durch eine Doppel-Färbung der Mitochondrien sowohl mit dem Mitotracker CMXRos als auch mit dem Anti-Mortalin-Antikörper konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Kanälen, in denen man Mitotracker CMXRos und Anti-Mortalin-Antikörper darstellt, eine nahezu 100%ige Übereinstimmung besteht (Abb. 3.8).

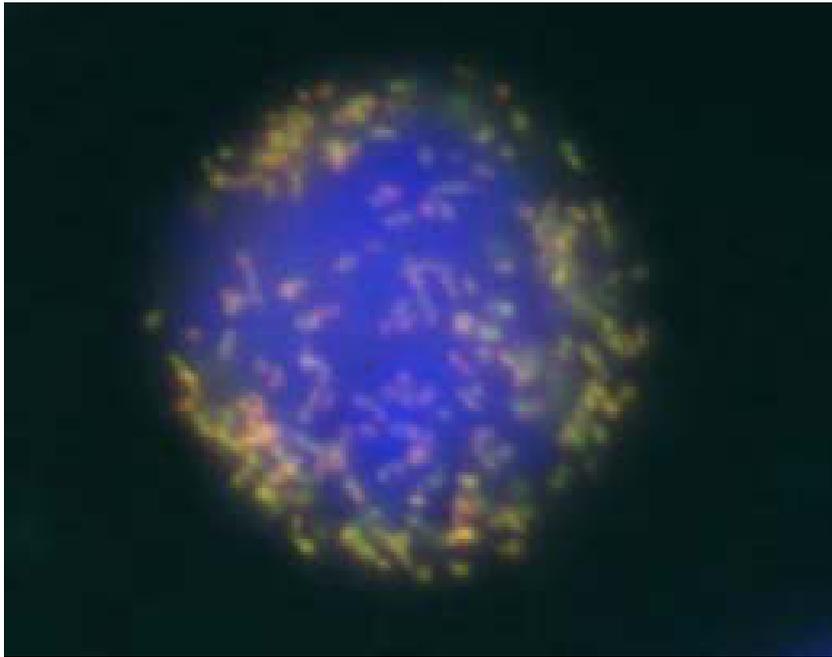


Abbildung 3.8: Runde Zelle aus MDS-KM
Mortalin ist mit Alexa488 gefärbt (grün), rot ist der MT CMXRos

3.2.6.2 Verteilungsmuster von Mortalin bei CD34⁺-Zellen aus MDS-Knochenmark

CD34⁺-Zellen von MDS-Patienten haben - wie oben gezeigt - an Tag 3 der Kultivierung nur einen sehr schmalen Zytoplasmasaum. Aufgrund dieser Tatsache wurden sowohl runde Zellen als auch solche mit polarisiertem Phänotyp beurteilt.

Die Mitochondrien befinden sich bei den runden Zellen um den Zellkern verteilt in dem dünnen Zytoplasmasaum (Abb. 3.8).

Haben die Zellen einen polarisierten Phänotyp angenommen, sind die Mitochondrien hauptsächlich an der Basis des Uropoden der Zelle lokalisiert (Abb. 3.9).

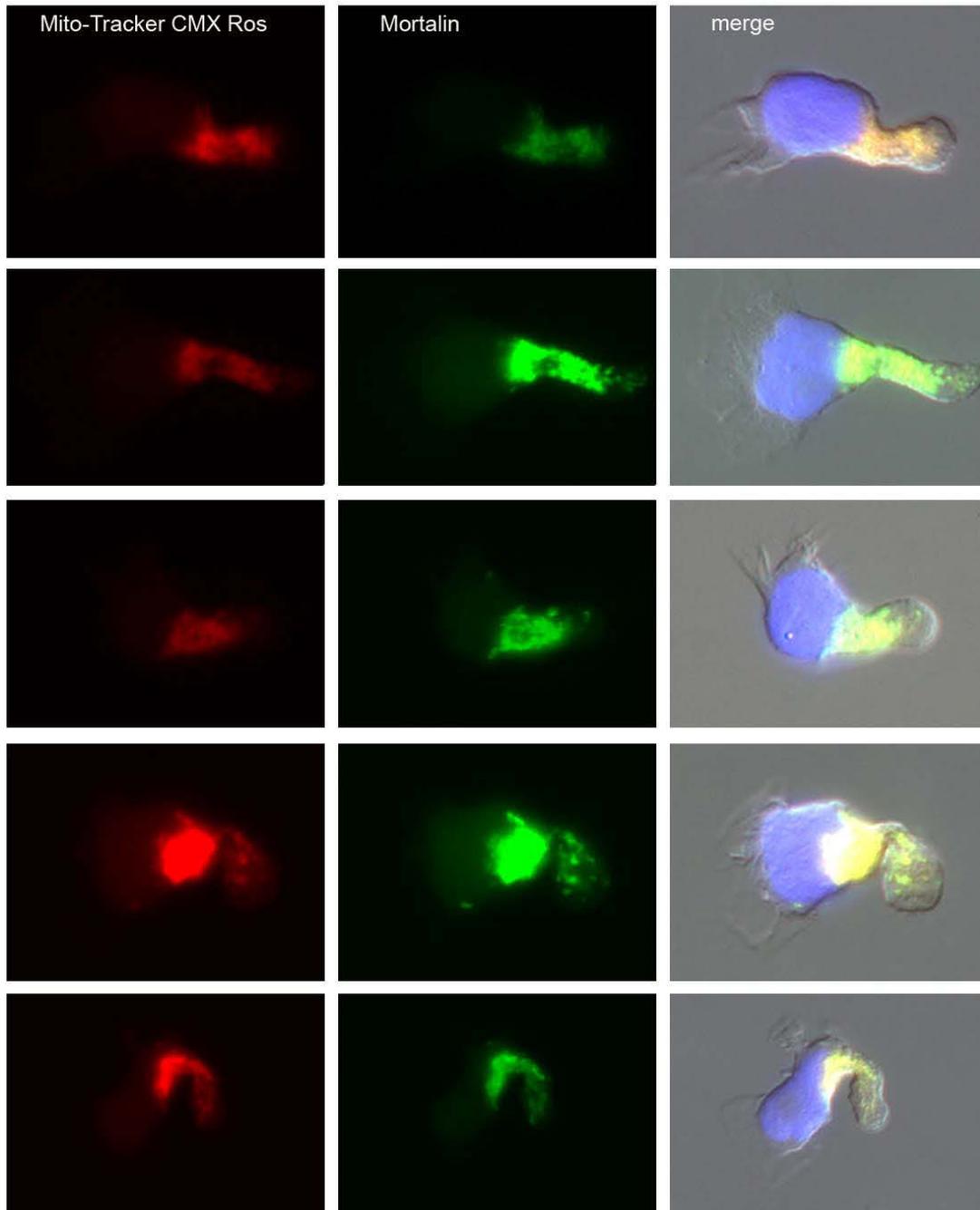


Abbildung 3.9: CD34⁺-Zellen aus MDS-KM an Tag 3 ihrer Kultivierung in I20⁺⁺⁺

In Gegenwart der entsprechenden Zytokine nahmen die Zellen einen Migrationsphänotyp an.

In Spalte 1 in rot der Mitotracker, in Spalte 2 Mortalin mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.2.6.3 Verteilungsmuster von Mortalin in CD34⁺-Zellen aus Apheresat

Das Verteilungsmuster von Mortalin in CD34⁺-Zellen aus Apheresat entspricht demjenigen der CD34⁺-Zellen aus MDS-KM (Abb. 3.9 und 3.10).

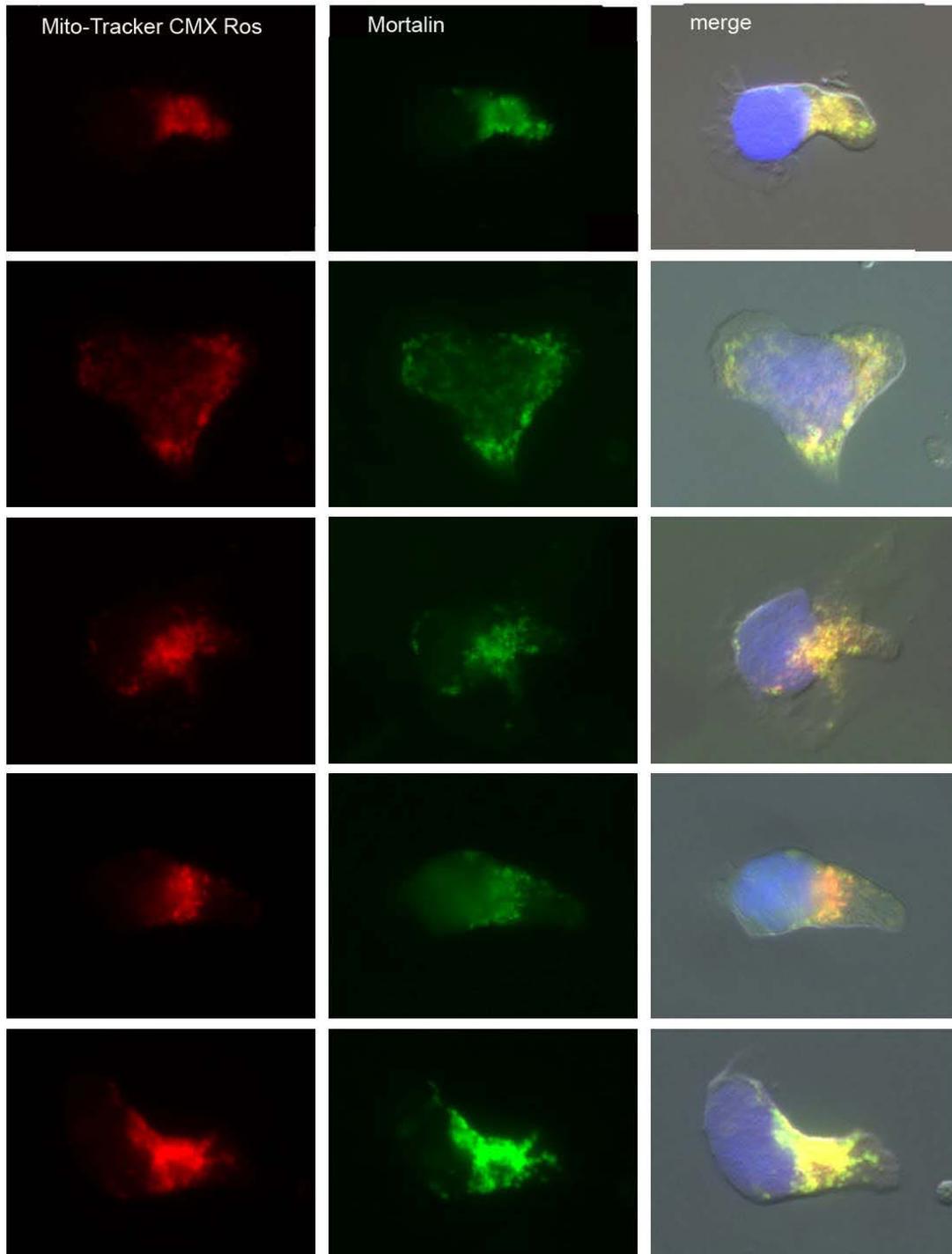


Abbildung 3.10: CD34⁺-Zellen aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in I20⁺⁺⁺
In Gegenwart der entsprechenden Zytokine nahmen die Zellen einen Migrationsphänotyp an.
In Spalte 1 in rot der Mitotracker, in Spalte 2 Mortalin mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Das intrazelluläre Verteilungsmuster von Mortalin in malignen und benignen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen ist nicht unterschiedlich.

3.2.6.4 Verteilungsmuster von Mortalin bei CD34⁺-Zellen aus Knochenmark von hämatologisch gesunden älteren Probanden

Es konnten 2 Knochenmarksproben von hämatologisch gesunden älteren Probanden analysiert werden. Aufgrund der geringen Zellzahl sowie dem geringen Anteil CD34⁺-Zellen konnte nur bei einem Probanden die immunhistochemische Färbung von CD34⁺-Zellen an Tag 3 durchgeführt werden. In diesem Knochenmark eines gesunden älteren Probanden war die Mortalin-Verteilung in CD34⁺-Zellen identisch mit der in CD34⁺-Zellen aus MDS-KM und CD34⁺-Zellen aus Apheresat (Abb. 3.11).

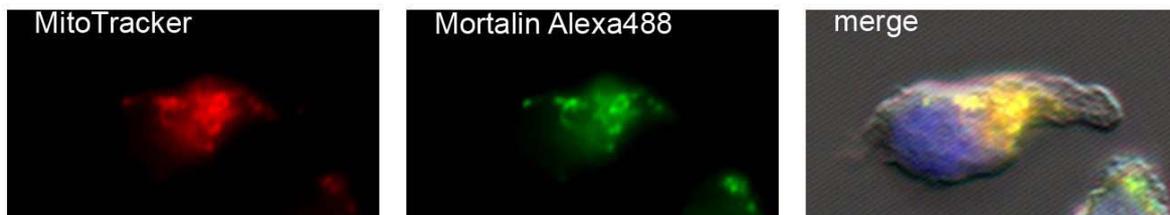


Abbildung 3.11 CD34⁺-Zellen eines hämatologisch gesunden älteren Probanden an Tag 3 ihrer Kultivierung in I20⁺⁺⁺

In Gegenwart der entsprechenden Zytokine nahmen die Zellen einen Migrationsphänotyp an.

In Spalte 1 in rot der Mitotracker, in Spalte 2 Mortalin mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.2.3 Verteilungsmuster von Mortalin während der Mitose

In dieser Arbeit sollte der Vermutung nachgegangen werden, dass es eine asymmetrische Verteilung der Mitochondrien auf die Tochterzellen von CD34⁺-Zellen gibt. Dazu wurden erneut immunhistochemische Färbungen an Tag 3 der Kultivierung durchgeführt. Die Präparate wurden nach Mitosen durchsucht und die Mitosen fotodokumentiert. Der dritte Tag der Kultivierung wurde der Beobachtung folgend gewählt, dass mit einsetzender Teilung der HSPZ Proteine wie z.B. der Transferrinrezeptor asymmetrisch segregieren. Giebel *et al.* konnten anhand von Proliferationskinetiken zeigen, dass dies unter den beschriebenen Bedingungen am häufigsten zwischen dem zweiten und dritten Tag der Kultivierung geschieht (2006). In 410 Mitosen aus 7 Apheresaten und 11 Mitosen aus 2 Knochenmark von MDS-Patienten konnte keine asymmetrische Verteilung von Mortalin auf die Tochterzellen gefunden werden (Abb. 3.12). Die Mortalin-Fluoreszenz befindet sich während der Mitose zunächst in der Teilungsfurche während der späteren Mitose-Stadien verteilen sich die Mitochondrien im gesamten Zytoplasma der Mitose-Figur.

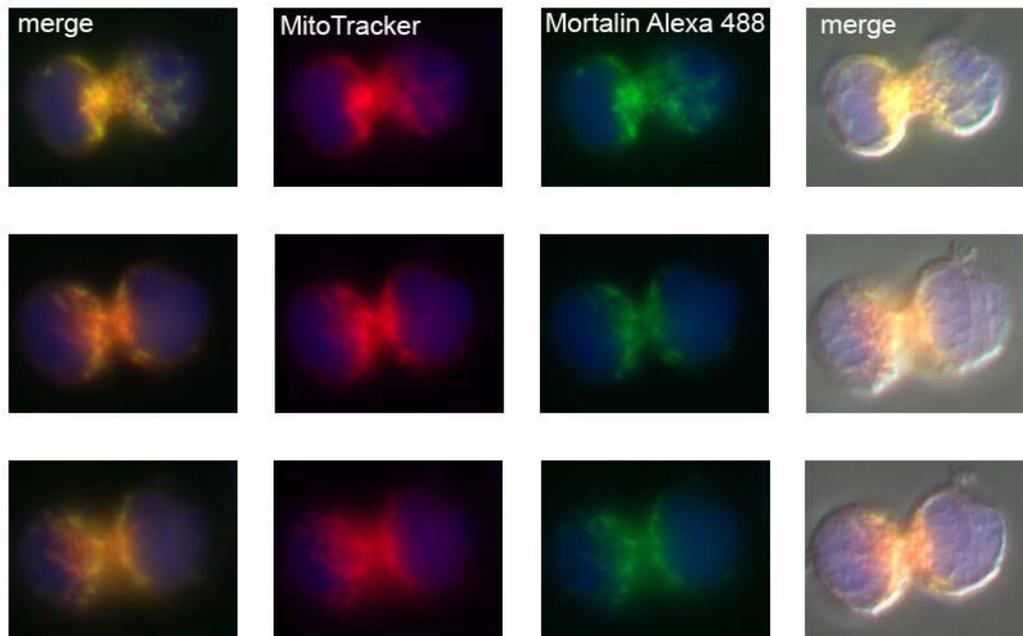


Abb.3.12: Mitose einer CD34⁺-Zelle aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in I20⁺⁺⁺
 In Spalte 1 Überlagerung von rot, grün und blau Kanälen, in Spalte 2 in rot der Mitotracker, in Spalte 3 Mortalin mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 4 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Um zu evaluieren, ob keine asymmetrischen Mitosen gefunden worden waren oder ob es keine asymmetrischen Mitosen in CD34⁺-Zellen bezüglich der Mortalinverteilung gab, wurde eine Doppel-Färbung sowohl von Mortalin als auch von CD71 oder CD63 durchgeführt. CD71 und CD63 wurden in kultivierten CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut als asymmetrisch segregierend beschrieben (Beckmann *et al.*, 2007).

Dazu wurden verschiedene Permeabilisierungsmethoden durchgeführt, MeOH und Triton X100. Für CD71 konnten 245 Mitosen aus 4 Apheresaten analysiert werden (Abb. 3.13), davon war in 2 Mitosen die CD71-Verteilung asymmetrisch, die von Mortalin symmetrisch (Abb. 3.16). Für CD63 konnten 34 Mitosen in einem Apheresat dokumentiert werden (Abb. 3.14), davon war in einer die Verteilung von CD63 asymmetrisch, die von Mortalin symmetrisch (Abb.3.15).

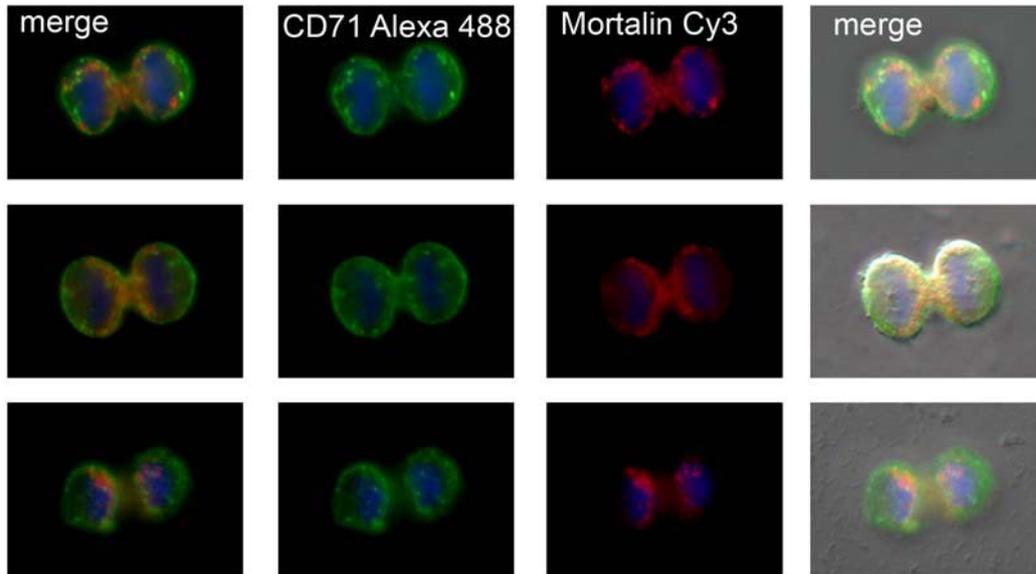


Abbildung 3.13: Symmetrische Mitose einer $CD34^+$ -Zelle aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in $I20^{+++}$

In Spalte 1 Überlagerung von rot, grün und blau Kanälen, in Spalte 2 in CD71 mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 Mortalin mit Cy3 angefärbt, in Spalte 4 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

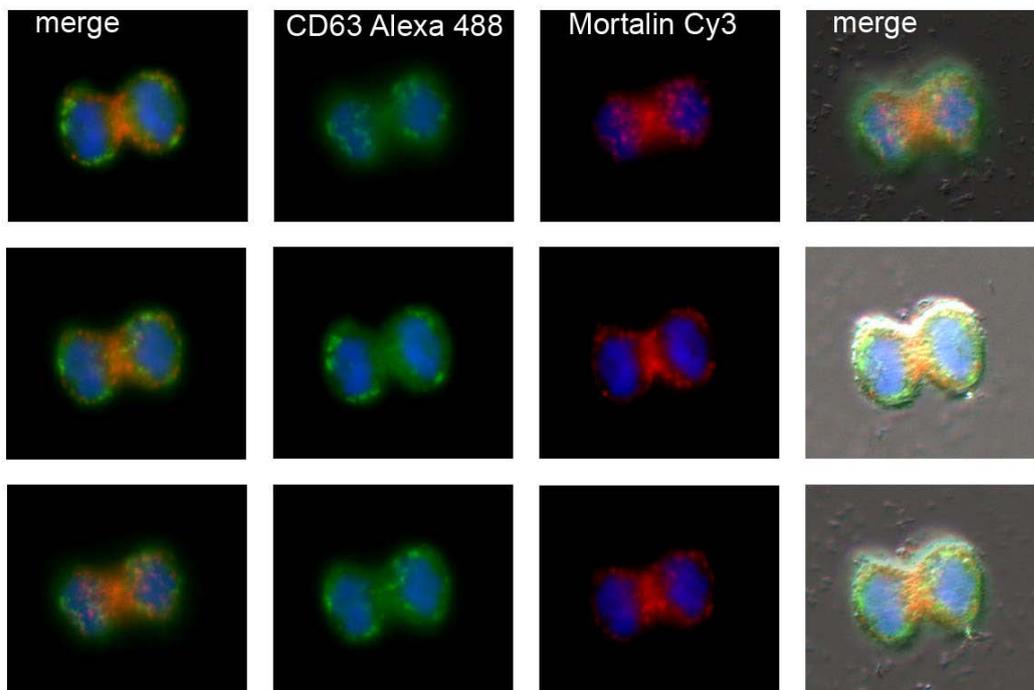


Abb.3.14: Symmetrische Mitose einer $CD34^+$ -Zelle aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in $I20^{+++}$
In Spalte 1 Überlagerung von rot, grün und blau Kanälen, in Spalte 2 in CD63 mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 Mortalin mit Cy3 angefärbt, in Spalte 4 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

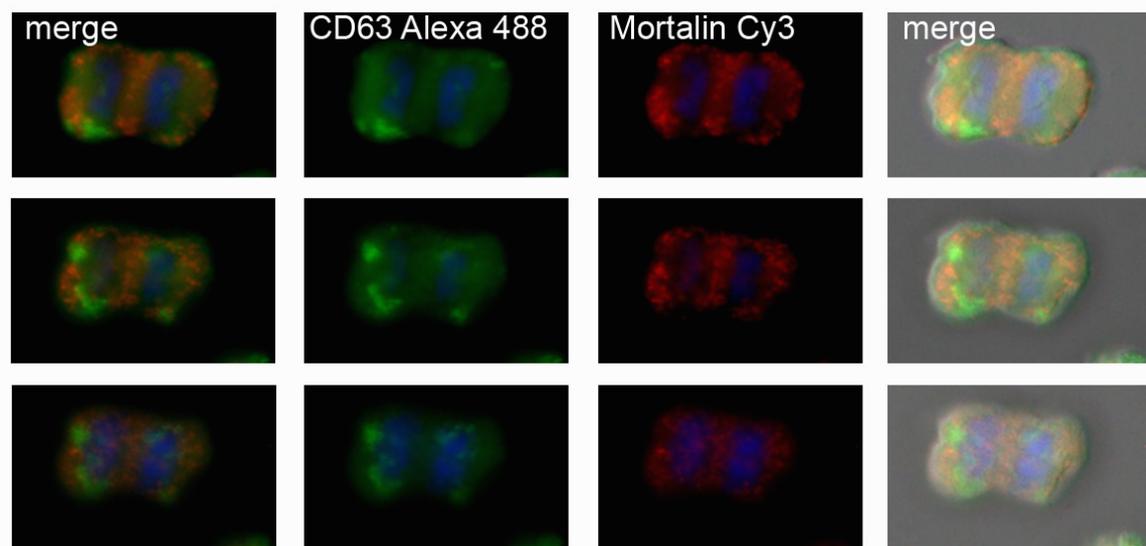


Abbildung 3.15: Asymmetrische Mitose einer $CD34^+$ -Zelle aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in $I20^{+++}$

In Spalte 1 Überlagerung von rot, grün und blau Kanälen, in Spalte 2 in CD63 mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 Mortalin mit Cy3 angefärbt, in Spalte 4 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die linke Zelle erhält mehr CD63 als die rechte Zelle.

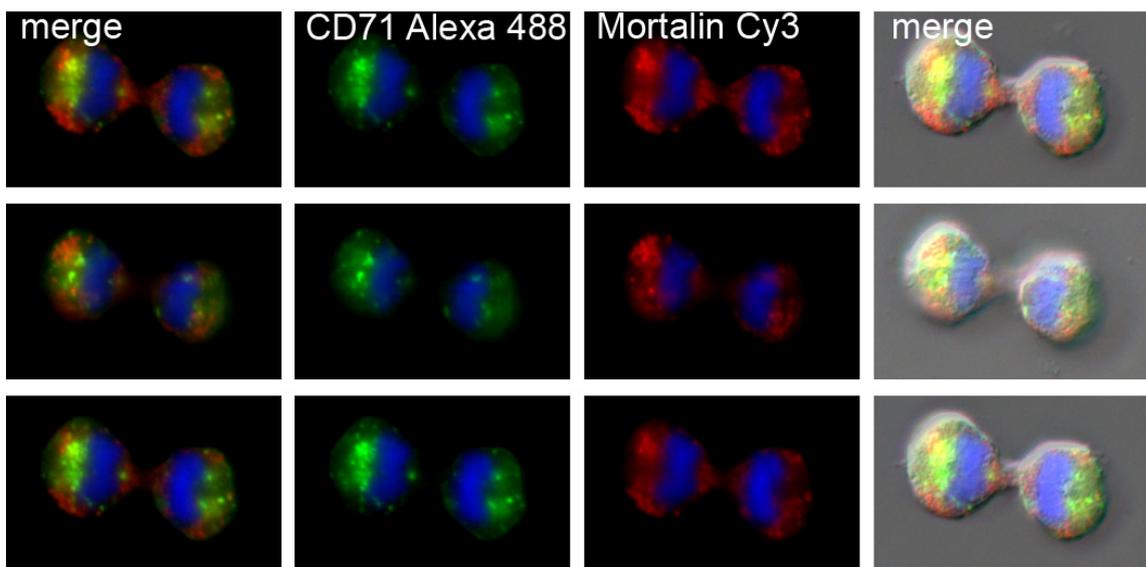


Abbildung 3.16: Asymmetrische Mitose einer $CD34^+$ -Zelle aus Apheresat an Tag 3 ihrer Kultivierung in $I20^{+++}$

In Spalte 1 Überlagerung von rot, grün und blau Kanälen, in Spalte 2 in CD63 mit Alexa488 angefärbt, in Spalte 3 Mortalin mit Cy3 angefärbt, in Spalte 4 die Überlagerung aller Kanäle. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die linke Zelle erhält mehr CD71 als die rechte Zelle.

3.3 Analyse von Komorbiditäten bei MDS-Patienten

Die hinsichtlich Komorbiditäten untersuchte Kohorte umfasste 171 Patienten (114 männlich und 57 weiblich). Das mediane Alter zum Diagnosezeitpunkt betrug 69 (24-88) Jahre. Außer BSC kamen keine spezifischen Therapien zum Einsatz. Gemäß IPSS befanden sich 23% der Patienten in der Niedrigrisikogruppe, 39% in der Intermediär-1-Risikogruppe, 24% in der Intermediär-2-Risikogruppe und 14% in der Hochrisikogruppe (Abb. 3.17).

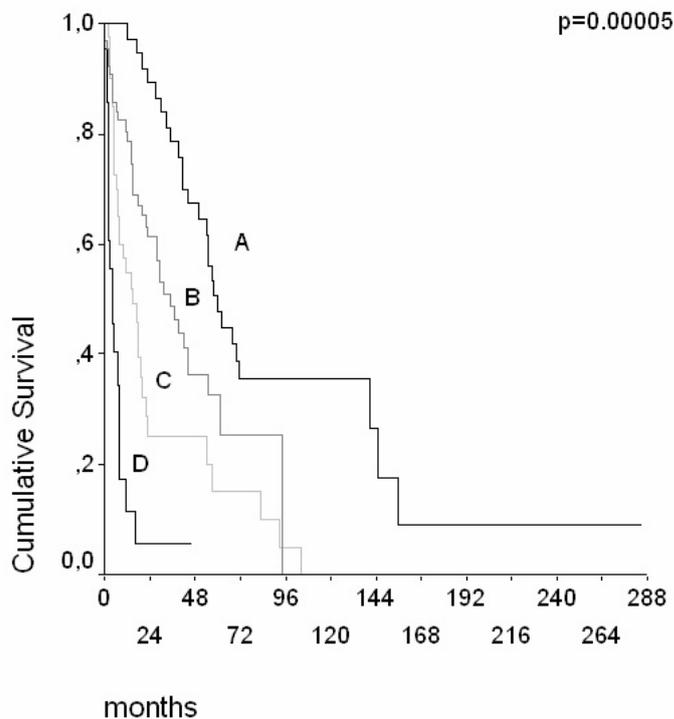


Abbildung 3.17 Kumulatives Überleben nach IPSS. A=Niedrigrisikogruppe, B=Intermediär-1-Risikogruppe, C=Intermediär-2-Risikogruppe, D=Hochrisikogruppe

3.3.1 Analyse von Komorbiditäten anhand des CCI

Gemäß Charlson Komorbiditäten Index (CCI) konnten bei 60 Patienten (35%) Komorbiditäten gefunden werden. 111 (65%) der Patienten wiesen keine relevanten Komorbiditäten auf, 37 (22%) hatten eine Komorbidität, 15 (9%) hatten zwei Komorbiditäten, 2 Patienten hatten drei Komorbiditäten, 6 Patienten hatten 4 Komorbiditäten und bei keinem der Patienten waren mehr als 4 Komorbiditäten zu finden.

Die häufigsten Komorbiditäten waren Diabetes ohne Komplikationen (21 Patienten) und Myokardinfarkt (12 Patienten). Neun Patienten litten zusätzlich an einem soliden Tumor. Weitere Komorbiditäten waren: Herzinsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankung, Diabetes mit Komplikationen, Hemiplegie, chronische Lungenerkrankung, Bindegewebserkrankungen, leichte Lebererkrankung und mäßige oder schwere Niereninsuffizienz.

Nach Berechnung des Scores wurden die Patienten in CCI-Risikogruppen eingeteilt. Das mediane Überleben der gesamten Kohorte betrug 30 Monate, Patienten in der Niedrigrisikogruppe überlebten 42 Monate, Patienten in der Intermediär-Risikogruppe überlebten 15 Monate und Patienten in der Hochrisikogruppe überlebten 19 Monate. Im Vergleich zu der Gesamtkohorte war das Überleben der Hochrisikogruppe deutlich eingeschränkt ($p=0,006$) (Abb. 3.18), während zwischen der Intermediär-Risikogruppe und der Hochrisikogruppe kein Unterschied gefunden wurde.

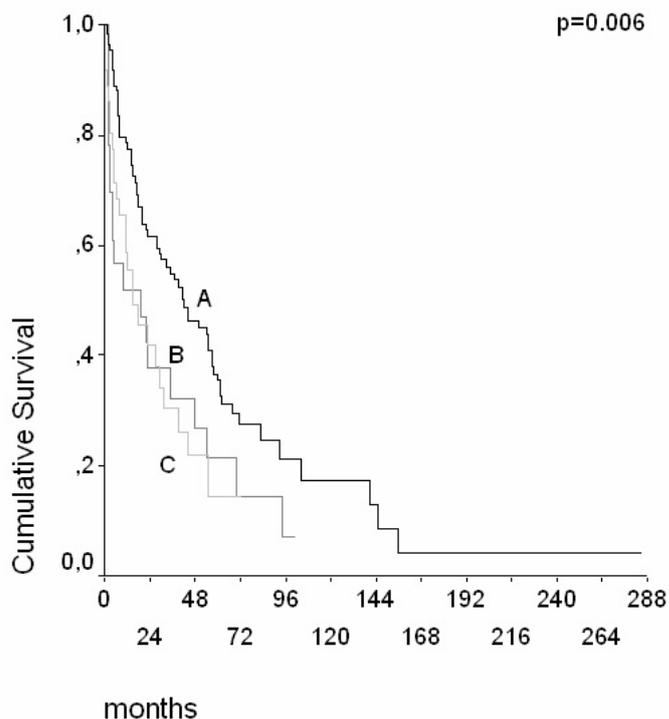


Abbildung 3.18 Kumulatives Überleben der Patienten nach CCI. A=Niedrigrisikogruppe, B=Intermediär-Risikogruppe, C=Hochrisikogruppe

Bei Verwendung des modifizierten CCI, der das Alter der Patienten berücksichtigt, ergab sich eine Niedrigrisikogruppe von nur 8 Patienten, die eine sehr gute Prognose aufwiesen.

Als nächstes wurde der Zusammenhang zwischen CCI und IPSS untersucht. Innerhalb der IPSS-Niedrigrisikogruppe und der IPSS-Hochrisikogruppe konnte der CCI die Patienten nicht weiter hinsichtlich ihrer Prognose auftrennen. Allerdings war es anhand der Komorbiditäten möglich, die Intermediär-1 und Intermediär-2-Risikogruppen weiter zu unterteilen: Die mittlere Überlebenszeit betrug 35 Monate bei Patienten mit einem CCI von 0, 15 Monate bei einem CCI von 1 und nur 4 Monate bei einem CCI von 2 oder mehr ($p=0,03$) (Abb.3.19).

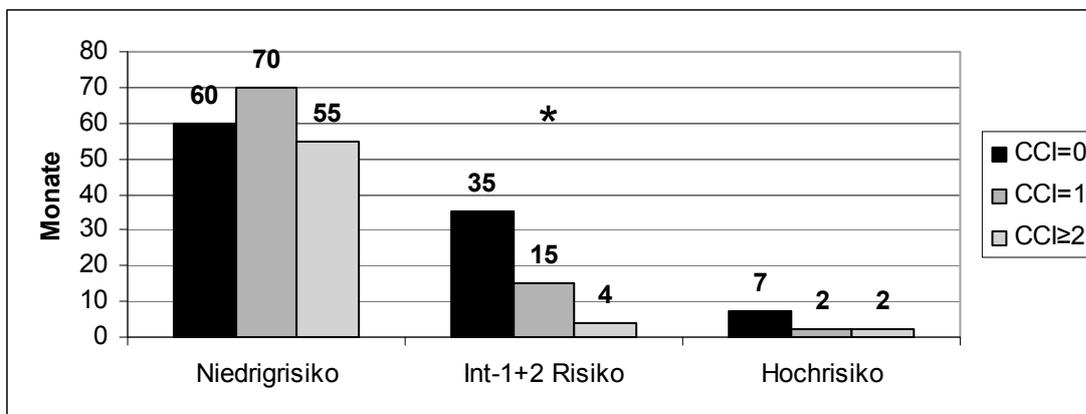


Abbildung 3.19 Auftrennung der IPSS Subgruppen nach CCI Risikogruppen

3.3.2 Analyse von Komorbiditäten anhand des HCTCI

Mit Hilfe des Komorbiditäts-Index für Patienten mit hämatopoietischer Stammzelltransplantation (HCTCI) war es möglich, bei 52% der Patienten Komorbiditäten aufzudecken. 47 Patienten hatten eine Komorbidität, 22 Patienten hatten zwei Komorbiditäten, 14 Patienten hatten drei, 4 Patienten hatten vier und 1 Patient hatte fünf Komorbiditäten. Die Verteilung auf die Risikogruppen ergab 82 Patienten in der Niedrigrisikogruppe, 69 Patienten in der Intermediär-Risikogruppe und 20 in der Hochrisikogruppe. Die häufigsten Komorbiditäten waren Infektion ($n=39$) und Herzkrankung ($n=25$). Es konnte keine Korrelation zwischen kardialen Problemen und dem Schweregrad der Anämie gefunden werden, auch nicht zwischen Infektionen und der Neutrophilenzahl. Patienten mit einem HCTCI-Score von 0 hatten ein medianes Überleben von 68 Monaten, solche mit einem Score von 1 oder 2 hatten ein medianes Überleben von 34 Monaten, und Patienten mit einem Score von 3 oder mehr hatten ein medianes Überleben von nur 25 Monaten ($p<0,001$) (Abb. 3.20).

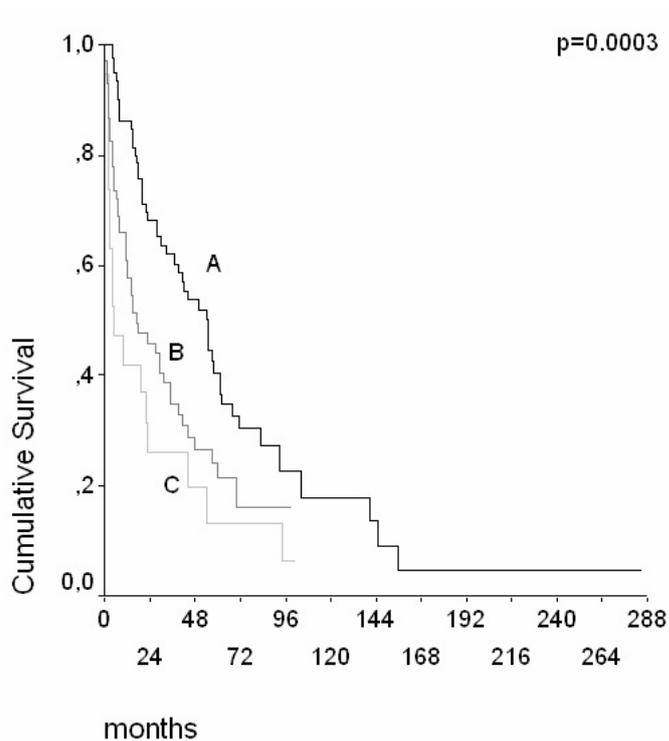


Abbildung 3.20 Kumulatives Überleben nach HCTCI. A=Niedrigrisikogruppe, B=Intermediär-Risikogruppe, C=Hochrisikogruppe

Es war weiterhin möglich, mit Hilfe des HCTCI die IPSS-Intermediär-2-Patienten und die IPSS Hochrisikogruppe weiter aufzutrennen ($p=0,016$; $p=0,0026$). In den beiden anderen IPSS-Risikogruppen konnte der HCTCI keine zusätzliche prognostische Information liefern (Abb. 3.21).

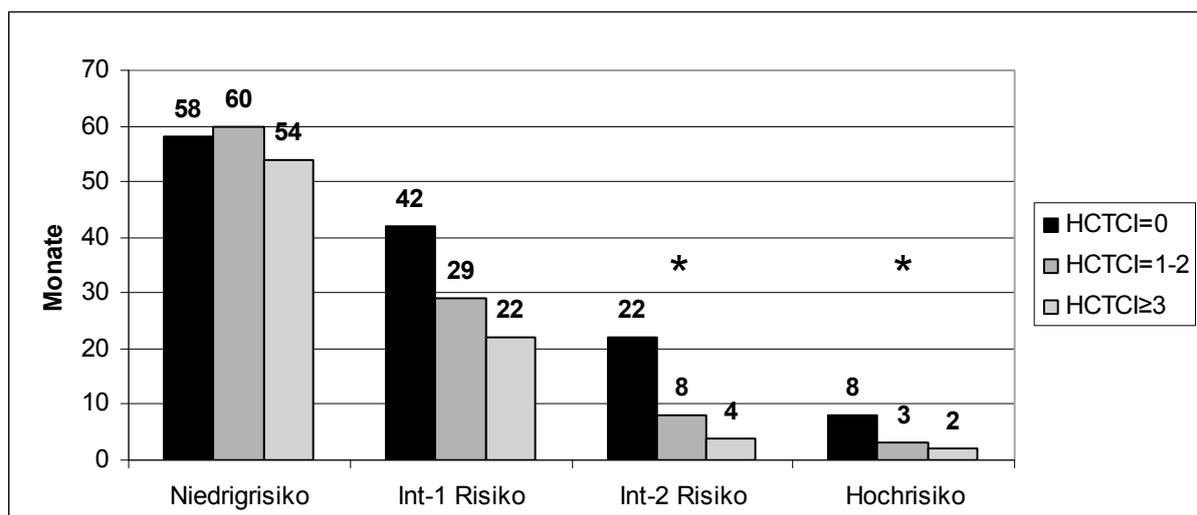


Abbildung 3.21 Auftrennung der IPSS Subgruppen nach HCTCI Risikogruppen

Mit Hilfe der univariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass Lungenerkrankungen, gastrointestinale Ulzera, Herzerkrankungen sowie Infektionen unabhängige prognostische Faktoren bezüglich des Überlebens waren.

3.3.3 Multivariate Analyse der Komorbiditäts-Indices

Eine multivariate Analyse mithilfe des Cox-Regressionsmodells ergab, dass der HCTCI unabhängig vom IPSS prognostische Informationen liefern kann ($p=0,006$), der CCI jedoch nicht. Das Alter wurde ebenfalls nicht in das Regressionsmodell aufgenommen, d.h. dass das Alter in dieser Kohorte kein unabhängiger prognostischer Faktor zusätzlich zum IPSS ist.

3.3.4 Nicht-leukämische Todesursachen

In den HCTCI-Risikogruppen unterschied sich der Anteil der Patienten, die an anderen Todesursachen als an einer Leukämie verstarben, signifikant (53% der Niedrigrisiko-Patienten, 61% der Intermediärrisiko-Patienten und 85% der Hochrisiko-Patienten ($p=0,0093$)).

IV Diskussion

4.1 Mutationsanalysen

4.1.1 RARS-T

Die vorliegende Doktorarbeit leistet mit ihren molekulargenetischen und klinischen Ergebnissen einen Beitrag zur Definition und klassifikatorischen Einordnung der RARS-T, deren Beziehung zu MDS bzw. MPS schon seit einiger Zeit diskutiert wird. Rogers-Streeter *et al.* waren die ersten, die Patienten mit sideroblastischer Anämie und Thrombozytose ($>500.000/\mu\text{l}$) untersuchten. Sie beschrieben, dass diese Patienten ($n=17$) zum Diagnosezeitpunkt jünger waren (medianes Alter 55 Jahre) als Patienten mit RARS (70 Jahre) und länger überlebten. Außerdem trat bei keinem der Patienten eine leukämische Transformation auf, aufgrund dessen die Autoren die Schlussfolgerung zogen, dass der zugrundeliegende Proliferationsvorteil ein anderer sein müsse als der, der zu einer Leukämie führe (1977).

2001 wurde in der WHO-Klassifikation für myeloische und lymphatische Tumoren die Gruppe der MDS/MPN *Overlap*-Syndrome geschaffen, in der erstmalig die provisorische Entität einer *refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis* (RARS-T) definiert wurde. Für diese Diagnose waren 15% Ringsideroblasten im Knochenmark erforderlich, und der diagnostische Schwellenwert für die Thrombozytose wurde auf $600.000/\mu\text{l}$ festgelegt (Jaffe und Harris, 2001). Dieser Schwellenwert war jedoch umstritten. Shaw *et al.* (2005) schlugen vor, die relevante Thrombozytenzahl auf $500.000/\mu\text{l}$ zu senken, um Fälle mit weniger stark ausgeprägter Thrombozytose nicht zu verkennen. Um die diagnostischen Kriterien für ET und RARS-T zu vereinheitlichen, gilt in der revidierten WHO-Klassifikation von 2008 eine Thrombozytose von mindestens $450.000/\mu\text{l}$ als Schwellenwert.

Aufgrund der Tatsache, dass im Knochenmark dieser Patienten eine proliferative Komponente vorliegen muss, die zu einer Entwicklung einer Thrombozytose führt, wurden folgende Mutationsanalysen durchgeführt:

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte die JAK2 V617F-Mutation bei 50% der Patienten mit RARS-T und Thrombozyten $>600.000/\mu\text{l}$ nachgewiesen werden (Zipperer *et al.*, 2007, Gattermann *et al.*, 2007). Diese Mutationshäufigkeit stimmt gut mit den in der Literatur veröffentlichten Daten überein (Remacha *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Ceesay *et al.*, 2006; Szpurka *et al.*, 2006; Boissinot *et al.*, 2006).

Betrachtet man alle in der Literatur beschriebenen Patienten, die initial auf JAK2 V617F untersucht wurden, dann lassen von 33 RARS/RARS-T Patienten mit einer Thrombozytenzahl zwischen 400.000 und 600.000/ μ l nur 3 (9%) eine JAK2 V617F Mutation erkennen, im Gegensatz zu 27 von 45 Patienten (60%) mit einer Thrombozytenzahl über 600.000/ μ l. Ein diagnostischer Schwellenwert von 600.000/ μ l scheint daher angemessener zu sein, wenn man davon ausgeht, dass die JAK2 V617F-Mutation ein wichtiges Charakteristikum der RARS-T ist. Ein diagnostischer Schwellenwert von 600.000/ μ l wird auch durch Untersuchungen von Wang *et al.* unterstützt, die morphologische Unterschiede in der Megakaryopoese zwischen Patienten mit milder (<600.000/ μ l) und ausgeprägter Thrombozytose sahen (2006). Der Anteil der Allele, die die Mutation tragen, schwankte in unseren Untersuchungen zwischen 5% und 60%. Ein Patient mit 60% JAK2 V617F-mutierten Allelen war als homozygot zu klassifizieren, wenn man davon ausgeht, dass 100% heterozygot mutierter Allele maximal einen Anteil von 50% ausmachen können. Patienten mit ET sind fast immer heterozygot. Schmitt-Gräff *et al.* konnten anhand seriell gewonnener Proben zeigen, dass mit steigender Mutationslast auch die Thrombozytenzahl ansteigt. Malcovati *et al.* beobachteten, dass bei initial JAK2 V617F-negativen RARS-Patienten, die einen Thrombozytenanstieg entwickelten und dementsprechend als RARS-T neu klassifiziert werden mussten, die JAK2 V617F-Mutation nachweisbar wurde (2009). In unserer Kohorte fand sich, möglicherweise wegen der relativ kleinen Zahl von Patienten kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der mutierten Allele und der Thrombozytenzahl. Die bislang veröffentlichten Daten sprechen jedoch dafür, dass die Deregulierung von JAK2 der Entwicklung einer RARS-T vorausgeht.

Bei JAK2 V617F-positiven Patienten sind die Erythrozytenzahlen höher und das MCV kleiner, d.h. die JAK2-bedingten Einflüsse sind gegenläufig zu den eher megaloblastoiden Veränderungen einer sideroblastischen Erythropoese (Schmitt-Gräff *et al.*, 2008). In unserem Kollektiv hatten JAK2 V617F-positive Patienten signifikant höhere Leukozyten ($p=0,03$) und Thrombozyten ($p=0,03$). In der Literatur finden sich nicht immer signifikante Unterschiede (Ceesay *et al.*, 2006; Szpurka *et al.*, 2006), wahrscheinlich ebenfalls aufgrund kleiner Patientenzahlen. Fasst man die veröffentlichten Fälle zusammen, so haben JAK2-positive Patienten signifikant höhere Hb-Werte (Remacha *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Ceesay *et al.*, 2006; Szpurka *et al.*, 2006; Boissinot *et al.*, 2006; Gattermann *et al.*, 2007).

Ähnlich wie bei Remacha *et al.* (2006) beschrieben war die JAK2-Mutation für unsere Patienten, im Gegensatz zu der Einschätzung von Schmitt-Gräff *et al.* (2008), nicht mit einem Überlebensvorteil verbunden. Der prognostische Vergleich zwischen RARS-T und RARS fällt also nicht eindeutig aus.

Malcovati *et al.* konnten anhand von X-Chromosom-Inaktivierungsmustern (XCIP) nachweisen, dass es sich bei der RARS-T um eine klonale Erkrankung handelt. Wie bei den myeloproliferativen Syndromen (Kravolics *et al.*, 2006) findet sich aber auch bei RARS-T die JAK2 V617F-Mutation nur in einem Teil der XCIP-definierten klonalen Granulozyten. Das bedeutet, dass es andere, bislang nicht entdeckte Mutationen geben könnte, die bereits eine klonale Expansion bewirkt haben, ehe die JAK2-Mutation auftritt. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass sich bei Patienten mit JAK2 V617F-positiven myeloproliferativen Syndromen JAK2 V617F-negative Leukämien entwickeln können (Campell *et al.*, 2006), die wahrscheinlich von dem JAK2-negativen Ursprungsklon ausgehen. In der Literatur finden sich nur zwei Fälle von RARS-T mit JAK2-Mutation, die in eine sAML transformierten (Wang *et al.*, 2006; Pich *et al.*, 2009), was auf die relative Benignität der JAK-2-Mutation hindeutet (Campell *et al.*, 2006).

Bei keinem der Düsseldorfer RARS-T-Patienten konnte eine MPL-Mutation nachgewiesen werden. Auch andere Arbeitsgruppen fanden bei RARS-T nur sporadisch MPL-Mutationen (Schmitt-Gräff *et al.*, 2008 1/23; Steensma *et al.*, 2006 0/10; Malcovati *et al.*, 2009 2/19; Schnittger *et al.*, 2008 1/1). Selten kommen JAK2- und MPL-Mutationen gemeinsam vor (Malcovati *et al.*, 2009). Lasho *et al.* beobachteten dies bei einigen MPS-Patienten, wobei der Anteil der MPL-positiven Zellen stets größer war als der Anteil JAK2-V617F-positiver Zellen (2006). Die Autoren boten als Erklärungsmöglichkeit an, dass die beiden Mutationen entweder in unterschiedlichen Klonen entstehen oder dass der JAK2 V617F-Klon einen Subklon des MPL W515L-Klons darstellt. Insgesamt unterstützt unsere Untersuchung die Schlussfolgerung, dass MPL-Mutationen wegen ihrer Seltenheit als Ursache des Proliferationsvorteiles bei RARS-T wohl zu vernachlässigen sind.

Von einigen Autoren ist die Möglichkeit in Betracht gezogen worden, dass es sich bei RARS-T um die Koexistenz zweier unterschiedlicher Erkrankungen handeln könnte, nämlich RARS und ET. Wenn man jedoch deren Inzidenzen berücksichtigt (ET: 0,59-2,53 Fälle pro 100.000 pro Jahr (Briere *et al.*, 2007); MDS: ca. 4-5/100.000/Jahr (Germing *et al.*, 2004); RARS: <1/100.000/Jahr (10-15% der MDS-Diagnosen, (Greenberg *et al.*, 1997; Hamblin, 2009)), dann könnte die Kombination von RARS und ET, vorausgesetzt es handelt sich um unabhängige Ereignisse, höchstens mit einer Häufigkeit von 1/10.000.000.000/Jahr auftreten. Die Inzidenz von RARS-T liegt gemäß Düsseldorfer MDS-Register jedoch etwa 300-fach höher, nämlich bei 3/100.000.000/Jahr bzw. bei 21 Fällen über einen Zeitraum von etwas über 20 Jahren (RARS-T mit Thrombozyten >600.000 μ l). Dementsprechend kann eine zufällige Koinzidenz von RARS-T und ET weitgehend ausgeschlossen werden.

RARS-T als eine Variante der ET zu betrachten, ist ebenfalls problematisch. Wang *et al.* (2006) fanden bei RARS-T niedrigere Thrombozyten und Hb-Werte, ein höheres MCV und ein kürzeres Überleben als bei ET (2006). Auch in der Studie von Schmitt-Gräff *et al.* hatten Patienten mit RARS-T eine kürzere Überlebensdauer; sie waren allerdings auch im Mittel älter (Median: 71 J.) als Patienten mit ET oder IMF. Boissinot *et al.* (2006) fanden auch *in vitro* Unterschiede zwischen ET und RARS-T. Sie beobachteten, dass vier Patienten mit RARS-T (positiv für JAK2 V617F) im *colony assay* keine endogenen megakaryozytären Kolonien bildeten, im Gegensatz zu Patienten mit ET, bei denen endogenes megakaryozytäres Koloniewachstum in etwa 85% der Fälle zu finden ist. Remacha *et al.* (2006) zeigten, dass bei zwei RARS-T Patienten (positiv für JAK2 V617F) auch keine endogenen erythroiden Kolonien (EEC) gebildet wurden und weniger BFU-E vorhanden waren. Bei myeloproliferativen Syndromen geht die JAK2-Mutation im Allgemeinen mit einer gesteigerten Zahl von EEC einher. Nach der Entdeckung der JAK2- und MPL-Mutationen kam auch die Freiburger Arbeitsgruppe, die 2002 noch der Ansicht war, dass Patienten mit ET-RS (gleichbedeutend mit RARS-T) auf der Basis morphologischer Befunde eindeutig den Diagnosen ET bzw. idiopathische Myelofibrose (IMF) bzw. MDS zugeordnet werden könnten, zu dem Schluss, dass RARS-T als eigene Entität anzusehen ist (Schmitt-Gräff *et al.*, 2002 und 2008).

Für eine Abgrenzung zwischen RARS-T und RARS sprechen auch die Ergebnisse von Genexpressionstudien. Malcovati *et al.* (2009) fanden, dass das Phänomen der Ringsideroblasten bei RARS und RARS-T zwar mit ähnlichen Veränderungen in der Expression Erythropoiese-relevanter Gene assoziiert ist (z.B. Hochregulation von ALAS2, Herabregulation von ABCB7), dass sich RARS und RARS-T hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils jedoch unterscheiden lassen.

Aufgrund eigener Resultate und unter Berücksichtigung der bislang in der Literatur veröffentlichten Beobachtungen und Versuchsergebnisse halten wir folgende Pathogenese der RARS-T für wahrscheinlich:

- 1) Für den sideroblastischen Phänotyp, der eine abnorme mitochondriale Eisenakkumulation widerspiegelt, dürften Mutationen verantwortlich sein, die nichts mit dem myeloproliferativen Wachstumsvorteil zu tun haben. Diese „RARS-Mutationen“ entstehen in einer hämatopoietischen Stammzelle, manifestieren sich aber hauptsächlich in erythropoietischen Zellen, da diese wegen ihrer intensiven Hämsynthese auf ungestörten mitochondrialen Eisenstoffwechsel angewiesen sind. Ohne Zusatzmutationen, die der betroffenen Stammzelle einen Wachstumsvorteil verleihen, könnten „RARS-Mutationen“ keine klonale Knochenmarkserkrankung hervorrufen.
- 2) Bei RARS-T trägt offenbar die JAK2-V617F-Mutation zum erforderlichen Proliferationsvorteil bei. Analog hierzu müssen bei Patienten mit RARS andere, noch unbekannt Mutationen diese Rolle übernehmen.
- 3) Verschiedene Versuchsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass die JAK2-Mutation auch bei RARS-T nicht die einzige und außerdem nicht die erste Mutation ist, welche die klonale Expansion in Gang setzt. Als proliferativer „*first hit*“ kommen vielfältige genetische Veränderungen in Frage, wie z.B. eine Deletion 20q (Schaub *et al.*, 2009) oder TET2-Mutationen (Abdel-Wahab *et al.*, 2010).

Nach unserer Einschätzung handelt es sich bei der RARS-T um ein *overlap*-Syndrom, weil einerseits durch bislang unbekannt Mutationen ein MDS-typischer sideroblastischer Phänotyp (einschließlich typischer Genexpression) hervorgerufen wird, andererseits aber durch JAK2-V617F (und weitere Mutationen) Charakteristika myeloproliferativer Syndrome entstehen, wie z.B. megakaryozytäre Proliferation, Überproduktion von Thrombozyten, Myelofibrose und vaskuläre Ereignisse (Schmitt-Gräff *et al.*, 2008).

Wardrop und Steensma (2009) fragen sich, ob es gerechtfertigt sei, RARS-T als eigenständige Entität zu definieren, obgleich zu erwarten sei, dass die Diagnose nur bei etwa einem Patienten pro Zentrum pro Jahr gestellt wird. Diese Frage lässt sich wahrscheinlich erst dann positiv beantworten, wenn die korrekte Diagnose als Voraussetzung für eine wirksame Therapie benötigt wird.

4.1.2 JAK2 V617F bei MDS mit isolierter Deletion (5q)

Unter 41 Patienten mit MDS mit isolierter Deletion (5q) aus dem Düsseldorfer MDS-Register konnten wir 3 mit JAK2 V617F-Mutation identifizieren (7%) und dieses Ergebnis auch im Rahmen einer multizentrischen Studie bestätigen (Ingram *et al.*, 2006). In dieser Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass Patienten MDS mit isolierter Deletion (5q) mit JAK2-Mutation signifikant höhere Leukozytenzahlen, einen Trend zu höheren Thrombozytenzahlen sowie ein hyperzelluläres Knochenmark haben. Diese Ergebnisse unterstützen den Eindruck, dass die JAK2-Mutation zur Entstehung einer hyperproliferativen klonalen Hämatopoiese beiträgt.

4.1.3 JAK2 V617F bei MDS (allgemein) mit Thrombozytose

Bei den übrigen Patienten mit Thrombozytose (> 500.000): 18 RA (WHO: 1 RA; 17 RCMD), 5 CMML (WHO: 4 CMML-I; 1 CMML-II), 8 RAEB (WHO: 4 RAEB-I; 4 RAEB-II) und 2 RAEB-T konnten wir die JAK2 V617F-Mutation nur sporadisch (ca 1%) nachweisen, nämlich bei zwei Patienten mit RA und jeweils einem Patienten mit CMML und RAEB-T. Die geringe Mutationshäufigkeit stimmt ungefähr mit den Daten anderer Zentren überein, die bei ca. 5% aller MDS-Patienten eine JAK2-Mutation fanden (Steensma *et al.*, 2005). Die JAK2-Mutation scheint also in der Pathogenese der meisten MDS-Erkrankungen keine Rolle zu spielen, was wiederum die Schlussfolgerung unterstützt, RARS-T einen Sonderstatus zu verleihen.

4.2 Mortalin

4.2.1 Mortalin Verteilung in CD34⁺-Zellen

Der zweite Teil der Doktorarbeit wurde im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs GK 1033 (Altersforschung) durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopisch wurde die intrazelluläre Verteilung von Mortalin in CD34⁺-Zellen untersucht. Dabei sollte geklärt werden, welcher Typ der intrazellulären Distribution von Mortalin bei myelodysplastischen Syndromen vorliegt und ob altersabhängige Veränderungen zu beobachten sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob Mortalin bei der Mitose hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt wird.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Färbung von CD34⁺-Zellen mit dem Anti-Mortalin-Antikörper nahezu hundertprozentig mit der Färbung der Mitochondrien durch den Mitotracker CMXRos übereinstimmte, was auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Bhattacharyya *et al.*, 1995; Dahlseid *et al.*, 1994; Rivolta *et al.*, 2001). Extramitochondriale Lokalisationen (Ran *et al.*, 2000) können in CD34⁺-Zellen offenbar vernachlässigt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Mortalin und die Mitochondrien in den runden CD34⁺-Zellen stets im dünnen Zytoplasmasaum um den Zellkern herum befinden. Im Gegensatz zu größeren Zellen, z.B. Zellen solider Tumore, die reichlich Zytoplasma besitzen, ist wegen der geringen Größe der CD34⁺-Zellen eine Aussage zum Verteilungsmuster also weniger sinnvoll, da es gewissermaßen nur eine mögliche Verteilung gibt. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Verteilung der Mitochondrien in solchen CD34⁺-Zellen untersucht, die den stärker raumgreifenden Migrationsphänotyp angenommen hatten. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei CD34⁺-Zellen aus Knochenmark von MDS-Patienten als auch bei G-CSF-mobilisierten normalen CD34⁺-Zellen eine verstärkte Ansammlung von Mortalin in der Basis des Uropoden zu finden ist. Dies galt auch für einen hämatologisch gesunden älteren Probanden. Anscheinend gibt es zwischen klonal expandierten CD34⁺-Zellen bei MDS einerseits und benignen CD34⁺-Zellen andererseits keine substantiellen Unterschiede in der zytoplasmatischen Verteilung von Mortalin.

Es wurde auch kein Unterschied zwischen älteren und jüngeren Patienten oder zwischen *high-* und *low-risk* MDS gefunden. Eingeschränkt wird diese Aussage dadurch, dass es eventuell Unterschiede gibt, die nur elektronenmikroskopisch zu erfassen sind.

Dies ist unserem Wissen nach die erste Studie, die sich beim Menschen mit der Mortalinverteilung in frühen hämatopoietischen Progenitorzellen befasst; alle bislang beschriebenen Besonderheiten fanden sich in Tumorzellen bzw. Zelllinien (Wadhwa *et al* 2006). Prinzipiell ist es möglich, dass eine Veränderung der Mortalinverteilung erfolgt, sobald Stammzellen ihre Nische verlassen. Lonergan *et al.* (2006) beschrieben, dass sich in adulten Stammzellen von Rhesusaffen die Morphologie der Mitochondrien mit zunehmender Passage von perinukleär (bei erhaltener Multipotenz) über homogen verteilt bis zu aggregiert (in späten Passagen, in denen die *stemness* verloren gegangen ist) verändert. Auch für Oozyten der Rhesusaffen-Embryonen wurde beschrieben, dass die Mitochondrien-Formation sich während der Differenzierung verändert (Squirrel *et al.*, 2003). Das in dieser Doktorarbeit nachgewiesene Muster entspräche am ehesten der frühen Verteilung bei Lonergan *et al.*. Chen *et al.* (2009) vermuten, dass perinukleäres Arrangement ein optimales Mikromileu für die Kommunikation zwischen Zellkern und Mitochondrien ermöglicht, z.B. für die Translokation von Regulatoren der mitochondrialen Genexpression. Andere Autoren spekulieren, dass die perinukleären Mitochondrien den Zellkern vor größeren Fluktuationen der Kalziumkonzentration schützen (Park *et al.*, 2001).

Eine weitere Besonderheit im Vergleich mit bislang untersuchten Zelllinien ist der Befund, dass bei MDS-Patienten eine geringere Expression (*high-risk-MDS*) oder keine signifikant veränderte Expression von Mortalin (*low-risk-MDS*) vorlag (bislang unpublizierte Daten, Düsseldorf), im Gegensatz zu erhöhter Mortalin-Expression in den meisten untersuchten Tumorgeweben (Wadhwa *et al.*, 2006).

Xie *et al.* (2000) untersuchten die Expression von Mortalin in 13 myeloischen Leukämie-Zelllinien mit und ohne Deletion (5q). Die niedrigste Expression fand sich in der MUTZ1-Zelllinie, die von einem MDS-Patienten mit Deletion (5q) abstammt. Die Autoren konnten aber keine Korrelation zwischen dem Ursprung der Zelllinien und dem Expressionsniveau von Mortalin herstellen. Die DNA von drei der AML-Zelllinien wurde außerdem sequenziert, ohne dass Mortalin-Mutationen gefunden wurden. Auch bei MDS-Patienten konnten bisher keine Punktmutationen im Mortalin-Gen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, Düsseldorf). Kürzlich konnten Graubert *et al.* (2009) mit *high-throughput* Methoden in keinem der 3 Gene (inklusive Mortalin), die in der CDR 5q32.1 liegen, Punktmutationen oder kleine Deletionen finden, so dass es eher die Haploinsuffizienz von Genprodukten aus der CDR 5q32.1 ist, die ein MDS entstehen lässt.

4.2.2 Mortalin-Verteilung in CD34⁺-Zellen während der Mitose

Eine kritische Phase in der Stammzellentwicklung ist die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung. Das sogenannte intrinsische Modell postuliert hierbei eine asymmetrische Zellteilung, während das extrinsische Modell von einer ersten, vollständig symmetrischen Zellteilung ausgeht, deren Tochterzellen dann von extrinsischen Signalen entweder zur Selbsterneuerung oder zur weiteren Differenzierung gebracht werden. Für multipotente Zellen des Innenohrs konnten Rivolta *et al.* (2001) anhand einer Zelllinie eine asymmetrische Verteilung von Mortalin auf die Tochterzellen nachweisen, nicht jedoch für eine unipotente Zelllinie. Asymmetrische Verteilung der Mitochondrien wurde außerdem in dem eukaryontischen Organismus *Xenopus* beobachtet (Marinos 1986).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden CD34⁺-Zellen aus Apheresat mit Thrombopoietin, Stammzellfaktor und FLT3-Ligand (*sog. early-acting-cytokines*) kultiviert. Am dritten Tag wurden die Mitochondrien angefärbt, um deren Verteilung auf die Tochterzellen zu beurteilen. Fluoreszenzmikroskopisch konnte in 410 Mitosen keine asymmetrische Verteilung von Mortalin auf die Tochterzellen gefunden werden.

Auch durchflusszytometrisch ergab sich kein Anhalt für asymmetrische Zellteilung, die sich durch vermehrte Ausstattung der reiferen Zellen (CD133^{low}) mit Mitochondrien bemerkbar gemacht hätte. Allenfalls ließ sich eine Population von CD133^{low}-Zellen beschreiben, die weniger Mitotracker enthielten als die CD133^{intermediate} und CD133^{high} Zellen. Dementsprechend konnten Piccoli *et al.* (2006) eine inverse Beziehung zwischen CD34 und Mitotracker in CD34⁺-Zellen aus Apheresat feststellen.

Auch in Ko-Färbungen mit Mortalin und bekannten asymmetrisch segregierenden Markern (Beckmann *et al.*, 2007), nämlich CD71 (Transferrin-Rezeptor) bzw. CD63, konnten in CD34⁺-Zellen aus Apheresat keine asymmetrische Verteilungen von Mortalin nachgewiesen werden. Bei einer Untersuchung von CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut (Beckmann *et al.*, 2007) wurden für CD71 und CD63 ca. 20% asymmetrische Mitosen gefunden. Bei ähnlicher Frequenz hätten wir bei der Ko-Färbung mit CD63 unter 34 untersuchten Mitosen 7 asymmetrische Zellteilungen finden müssen, bei der Ko-Färbung mit CD71 unter 245 Mitosen 49 asymmetrische Teilungen. Möglicherweise ist die Rate asymmetrischer Mitosen in CD34⁺-Zellen aus Apheresat prinzipiell besonders niedrig oder die zur Stimulation verwendeten Zytokine wurden nicht in optimaler Konzentration eingesetzt. Takano *et al.* (2004) beschrieben, dass die Anzahl der HSC, die sich asymmetrisch teilen, von den verwendeten Zytokinen abhängig ist, was jedoch nicht mit den Erfahrungen von Giebel *et al.* (2004) übereinstimmt.

Insgesamt sprechen unsere Untersuchungen dafür, dass eine asymmetrische Verteilung von Mortalin und damit eine asymmetrische Verteilung der Mitochondrien keine entscheidende Rolle bei der Festlegung des Zellschicksals von CD34⁺-Zellen zu spielen scheint.

4.3 Analyse von Komorbiditäten bei Patienten mit MDS

Im dritten Teil der Doktorarbeit wurde untersucht, wie häufig Begleiterkrankungen bei MDS-Patienten vorkommen, ob es bevorzugte Komorbiditäten gibt und in welchem Zusammenhang sie mit den bisher etablierten Prognose-Scores stehen.

Als Goldstandard zur Abschätzung der Prognose gilt bei MDS nach wie vor das *International Prognostic Scoring System* (IPSS), das von Greenberg *et al.* (1997) entwickelt wurde. Der IPSS-Score beruht auf Daten, wie z.B. Karyotyp oder Anzahl der Zytopenien, die die Biologie der Index-Erkrankung reflektieren, nicht aber die „Biologie des Patienten“. Das vor kurzem von Malcovati *et al.* entwickelte WPSS (*WHO-classification-based Prognostic Scoring System*) berücksichtigt zusätzlich die Transfusionsbedürftigkeit, die nicht nur krankheits- sondern auch patientenzentriert ist, da Patienten unterschiedlich stark an ihrer Anämie leiden und deshalb unterschiedlich intensiv transfundiert werden.

Ein offensichtlicher Faktor der Patientenbiologie ist das Alter. Seit längerem wird über den Einfluss des Alters auf den Verlauf der MDS-Erkrankung diskutiert. Die spanische MDS-Arbeitsgruppe kam bereits 1989 zu dem Schluss, dass das Alter (>60 Jahre), die Thrombozytenzahl und der Blastenanteil den größten Einfluss auf das Überleben haben (Sanz *et al.*, 1989). Die Arbeitsgruppe um Aul konnte zeigen, dass Alter (>70 Jahre), der MDS-Typ RARS, LDH, Blastenanteil, Hb-Konzentration und Thrombozytenzahl unabhängige prognostische Faktoren sind (Aul *et al.*, 1992). Auch in der IPSS-Etablierungskohorte stellten Greenberg *et al.* (1997) einen unabhängigen Einfluss des Alters (>60 Jahre) fest. Schließlich zeigten Malcovati *et al.* (2005), dass auch innerhalb der einzelnen MDS-Typen der WHO-Klassifizierung das Alter ein unabhängiger Prognose-Faktor ist. Zum Teil ist das Patientenalter in Prognose-Scores integriert worden, nicht jedoch in die beiden wichtigsten Scores (IPSS und WPSS).

Zu weiteren klinischen Daten, die Auskunft über die Biologie von MDS-Patienten geben und sich evtl. auf deren Prognose auswirken, ist bislang kaum etwas bekannt. Mary Charlson *et al.* (1987) konnten jedoch zeigen, dass Komorbiditäten ganz entscheidende Parameter hinsichtlich der Prognose internistischer Patienten sind. Außerdem spielt die Erfassung von Komorbiditäten eine wichtige Rolle bei der Auswahl geeigneter Therapieverfahren.

Unsere Studie ist unserem Wissen nach die erste, die sich näher mit dem Problem von Begleiterkrankungen bei MDS-Patienten befasst hat (Zipperer *et al.*, 2008). Bei Patienten, die *Best Supportive Care* (BSC) erhielten, fanden wir Komorbiditäten (gemäß HCTCI) in 52% der Fälle. Besonders häufig waren Infektionen und koronare Herzerkrankungen. Komorbiditäten gingen mit verschlechterter Prognose einher. Wir konnten zeigen, dass der HCTCI im Gegensatz zum CCI Patienten mit MDS bezüglich ihrer Prognose in Untergruppen unterteilen kann. Obwohl dieser Score für *high-risk* Patienten entwickelt wurde, hatte er unabhängig vom IPSS prognostischen Einfluss in unserer Kohorte von Patienten, die BSC erhielten. Es gibt mehrere Gründe, warum der HCTCI für MDS-Patienten besser geeignet ist als der CCI. Erstens konnte er aufgrund anders definierter und gewichteter Parameter häufiger Komorbiditäten identifizieren (52% vs. 35% mit CCI). Dabei ist wichtig, dass der Faktor Herzerkrankungen im HCTCI durch koronare Herzkrankheit erweitert wurde, da diese Erkrankung nicht nur häufig ist, sondern besonders für anämische Patienten eine große Rolle spielt. Zur vollständigeren Erfassung komorbider Patienten hat auch die Berücksichtigung von Infektionen beigetragen, die bei 20% der Patienten vorlagen. Weiterhin ist der HCTCI besser für MDS-Patienten geeignet, weil er auf hämatologische Probleme abgestimmt wurde. Faktoren, die als Komorbiditäten nur schwer auf MDS-Patienten anzuwenden sind, wie z.B. Leukämie oder HIV-Infektion, wurden von Sorrow *et al.* ausgeschlossen.

Der HCTCI zeigte in den Hochrisikogruppen eine bessere Trennschärfe als der CCI, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass Kriterien, die eine Stammzelltransplantation ausschließen, ein stärkeres Gewicht erhielten.

Weder der HCTCI noch der CCI erreichten bei unseren Patienten eine gute Trennschärfe in der *low-risk*-Gruppe, obwohl die Sterblichkeit, die nicht mit der MDS-Erkrankung assoziiert ist, in diesem Kollektiv besonders hoch sein sollte. Möglicherweise lässt sich dieses Resultat damit erklären, dass in der *low-risk*-Gruppe nur ein Bruchteil der Patienten am Ende des Beobachtungszeitraums verstorben war.

Wang *et al.* (2009) konnten ebenfalls feststellen, dass Komorbiditäten die Prognose von MDS-Patienten verschlechtern. Unabhängige Prognosefaktoren waren vor allem Herzinsuffizienz und chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, während Diabetes die Prognose nicht beeinflusste.

Obgleich wir anhand der existierenden Scores zeigen konnten, dass Komorbiditäten die Prognose von MDS-Patienten beeinflussen, sind weder der CCI noch der HCTCI optimal auf die Mehrheit dieser Patienten zugeschnitten. Es fehlt ein leicht anzuwendender Score, der signifikante Ergebnisse für alle MDS-Untergruppen erzielt. Della Porta *et al.* stellten 2007 auf dem Jahreskongress der *American Society of Hematology* (ASH) erstmals einen Score vor, der speziell für MDS-Patienten entwickelt wurde. Dafür waren 840 in Padua diagnostizierte Patienten retrospektiv bezüglich ihrer Komorbiditäten analysiert worden. Die Arbeitsgruppe fand Begleiterkrankungen in 54% der Fälle, erwartungsgemäß umso häufiger, je älter die Patienten waren. Am häufigsten waren Herzerkrankungen. Eine multivariate Analyse ergab, dass Komorbidität das Risiko nicht-leukämischer Todesursachen erhöhte und das Gesamtüberleben verkürzte. Der Effekt war besonders ausgeprägt bei Patienten ohne Blastenvermehrung. Die anderen Patienten, die per definitionem den *higher-risk*-Kategorien gemäß IPSS angehörten, starben überwiegend an MDS-assoziierten Komplikationen wie AML und Blutungen. Unabhängige Prognoseparameter waren Herzerkrankungen, Leber- und Lungenerkrankungen sowie solide Tumore. Auf der Basis dieser Untersuchung wurde ein MDS-Komorbiditäts-Score erarbeitet, der Patienten in signifikant unterschiedliche Prognosegruppen stratifizieren kann. Dieser MDS-CI wurde 2008 auf dem ASH-Jahreskongress vorgestellt, nachdem er mit einer Kohorte aus dem Düsseldorfer MDS-Register validiert worden war. Die Gewichtung der einzelnen Komorbiditäten gründet sich auf den Regressionskoeffizienten in der multivariaten Analyse. Der MDS-CI umfasst fünf Parameter. Herzerkrankungen wurden aus oben genannten Gründen am höchsten gewichtet (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1 Parameter und Gewichtung des MDS-CI

Komorbidität	Score
Herzerkrankungen	2
Moderate bis schwere Lebererkrankung	1
Schwere Lungenerkrankung	1
Nierenerkrankung	1
Solider Tumor	1

Für den MDS-CI wurden 3 Risikogruppen etabliert, d.h. Niedrigrisiko (0 Punkte), intermediäres Risiko (1-2 Punkte), Hochrisiko (≥ 3 Punkte) (Della Porta *et al.*, 2008). Die Daten des Düsseldorfer MDS-Registers haben somit dazu beigetragen, speziell für MDS-Patienten erstmals einen geeigneten Komorbiditäts-Score zu entwickeln, der unabhängig vom IPSS zusätzliche prognostische Informationen liefert und im Rahmen von Therapieentscheidungen nützlich sein wird.

V Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei etwa 50% der Patienten mit RARS-T (refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose) die Mutation V617F in der Tyrosinkinase JAK2 vorliegt. Diese Mutation ist charakteristisch für myeloproliferative Syndrome (MPS). Die nosologische Einordnung der RARS-T ist problematisch, da die Erkrankung einerseits ein typisches Merkmal myelodysplastischer Syndrome (MDS) aufweist, nämlich Ringsideroblasten, d.h. pathologische Erythroblasten mit mitochondrialer Eisenüberladung, andererseits aber die Thrombozytose auf ein MPS hindeutet. Während die Mutationen, die den sideroblastischen Phänotyp verursachen, noch unbekannt sind, spielt die JAK2-Mutation offenbar eine wichtige Rolle für den Proliferationsvorteil des abnormen hämatopoietischen Klon. Es erscheint angemessen, dass die WHO-Klassifikation keine Zuordnung zu einer der beiden Krankheitsgruppen erzwingt, sondern die RARS-T als „*overlap syndrome*“ einordnet. Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass eine W515L/K-Mutation des Thrombopoietin-Rezeptors MPL, die bei essentieller Thrombozythämie vorkommt, bei RARS-T nicht nachweisbar ist. Die JAK2-V617F-Mutation fand sich schließlich noch bei einer Subgruppe von MDS-Patienten mit del(5q) als alleiniger Karyotyp-Anomalie, bei denen im Gegensatz zu anderen MDS-Patienten häufig eine leichte Thrombozytose vorliegt.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 1033 (Alterungsforschung) die intrazelluläre Lokalisation von Mortalin in CD34⁺-hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von MDS-Patienten und in G-CSF-mobilisierten CD34⁺-Zellen aus Apheresaten untersucht. Soweit bekannt, wirkt Mortalin hauptsächlich als intramitochondriales Chaperon. In Tumorzellen wurde von verschiedenen Autoren eine abnorme intrazelluläre Distribution beobachtet (perinukleäre vs. diffuse Verteilung). In der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch nach in-vitro-Kultivierung immunfluoreszenzmikroskopisch kein auffälliger Unterschied zwischen apheresierten normalen CD34⁺-Zellen und solchen aus MDS-Knochenmark feststellen. Es fand sich auch kein Unterschied zwischen jüngeren und älteren Probanden. Weiterhin wurde die Verteilung der Mitochondrien (inkl. Mortalin) während der Mitose von CD34⁺-Zellen untersucht, um festzustellen, ob asymmetrische Verteilung eine Rolle bei der Differenzierung von CD34⁺-Zellen spielt. Da die Distribution der Mitochondrien auf die Tochterzellen sowohl in Apheresat-Proben als auch in MDS-Proben symmetrisch war, scheint eine asymmetrische Verteilung der Mitochondrien für das weitere Zellschicksal von CD34⁺-Zellen keine wesentliche Rolle zu spielen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde erstmalig untersucht, wie häufig Begleiterkrankungen bei MDS-Patienten vorkommen, ob es bevorzugte Komorbiditäten gibt und inwiefern sie mit den bislang zur Verfügung stehenden Prognose-Scores adäquat erfasst werden. Obwohl der *Charlson Comorbidity Index* (CCI) und der *Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index* (HCTCI) einen Einfluss von Begleiterkrankungen auf die Prognose erkennen ließen, zeigte sich, dass beide nicht optimal auf MDS-Patienten zugeschnitten sind. Der neue MDS Comorbidity Index (MDS-CI), der von einer italienischen Arbeitsgruppe entwickelt wurde, konnte mithilfe der Datenbank des Düsseldorfer MDS-Registers validiert werden. Er versetzt den Anwender in die Lage, durch angemessene Berücksichtigung von Begleiterkrankungen eine prognostische Beurteilung vorzunehmen, die eine genauere Stratifizierung von MDS-Patienten zulässt als der bisherige Goldstandard des *International Prognostic Scoring System* (IPSS). Dies ist sowohl bei der Planung klinischer Studien als auch bei Therapieentscheidungen im klinischen Alltag von Nutzen.

VI Summary

In the first part of this doctoral thesis, I was able to show that in about 50% of patients with RARS-T (refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis) bone marrow cells carry a V617F mutation of the JAK2 tyrosine kinase. This mutation is characteristic of chronic myeloproliferative disorders (MPD). The nosology of RARS-T is problematic because, on the one hand, the disease shows a typical feature of myelodysplastic syndromes (MDS), namely ring sideroblasts, i.e. pathological erythroblasts showing mitochondrial iron accumulation, while, on the other hand, thrombocytosis points to an MPD. Whereas the mutations causing the sideroblastic phenotype are still unknown, the JAK2 mutation apparently confers an important proliferative advantage to the abnormal hematopoietic clone. It appears appropriate that the WHO classification, instead of enforcing allocation to either MDS or MPD, now accommodates RARS-T in the category of “overlap syndromes”. As a further result of our investigation, I confirmed that W515L/K mutations of the thrombopoietin receptor MPL, which occur in essential thrombocythemia, are not detectable in patients with RARS-T. JAK2-V617F was not restricted to RARS-T but was also found in a subgroup of MDS patients characterized by del(5q) as a sole karyotype anomaly, who frequently show moderate thrombocytosis.

In the second part of the thesis, which took place in the context of the DFG research training group GK 1033 (Molecular Targets of the Aging Process), I investigated the intracellular distribution of Mortalin in CD34-positive hematopoietic progenitor cells isolated either directly from the bone marrow of MDS patients or from G-CSF mobilized cytopheresis products. As far as we know, mortalin mainly acts as a mitochondrial chaperone. Several authors observed an abnormal intracellular distribution (perinuclear vs. diffuse) in tumor cells. However, using in vitro culture and immune fluorescence microscopy, we were unable to find a significant difference in mortalin distribution between CD34⁺ cells from MDS bone marrows and normal apheresis products. Neither was there a difference between younger and older probands. In addition, mortalin distribution was examined in mitotic CD34⁺ cells, in order to see whether differentiation of these cells was associated with asymmetrical distribution of mortalin among daughter cells. Since distribution always appeared to be symmetrical, we conclude that mitotic segregation of mortalin, and therefore mitotic segregation of mitochondria, does not appear to be involved in determining the cell fate of early hematopoietic progenitors.

In the third part of this work we studied, for the first time, the frequency and spectrum of comorbidities in patients with MDS, and whether these comorbidities are adequately reflected by scoring systems that are available to date. Although the Charlson Comorbidity Index (CCI) and the Hematopoietic Stem Cell Transplantation Comorbidity Index (HCTCI) showed that comorbidities have a prognostic impact, it became clear that both scoring systems are not optimally suited for patients with MDS. The new MDS comorbidity index (MDS-CI), developed by an Italian group of researchers, was validated with data from the Düsseldorf MDS Registry. The MDS-CI facilitates adequate prognostic assessment of MDS patients by ensuring proper consideration of comorbidities. This is an improvement over the International Prognostic Scoring System (IPSS) which has been the gold standard up to now. Improved prognostication will aid proper stratification in clinical trials as well as therapeutic decision-making in day-to-day clinical practice.

VII Literaturverzeichnis

- Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):447-52.
- Abe M, Suzuki K, Inagaki O. A novel MPL point mutation resulting in thrombopoietin-independent activation. *Leukemia* 2002;16:1500-1506
- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S *et al.* Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med.* 1976 Oct 21;295(17):913-6.
- Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia* 1992;6:52-9.[
- Bhattacharyya T, Karnezis AN, Murphy SP, Hoang T, Freeman BC, Phillips B, Morimoto RI Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J Biol Chem.* 1995 Jan 27;270(4):1705-10.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–1061
- Beckmann J, Scheitza S, Wernet P. *et al* Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 2007 Jun 15;109(12):5494-501.
- Bennett JM A comparative review of classification systems in myelodysplastic syndromes (MDS). *Semin Oncol.* 2005 Aug;32(4 Suppl 5): 3-10
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1982 Jun;51(2):189-99.
- Boissinot M, Garand R, Hamidou M, *et al.* The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood.* 2006 Sep 1;108(5):1781-2.
- Bouchardy C, Rapiti E, Fioretta G, Laissue P, Neyroud-Caspar I, Schäfer P, Kurtz J, Sappino AP, Vlastos G. Undertreatment strongly decreases prognosis of breast cancer in elderly women. *J Clin Oncol.* 2003 Oct 1;21(19):3580-7.
- Bowen D, Peddie C. Mitochondrial oxygen consumption and ineffective haematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2002;18:345-6.
- Brière JB. Essential thrombocythemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2007 Jan 8;2:3. Review.
- Cabello AI, Collado R, Ruiz MA, *et al.* A retrospective analysis of myelodysplastic syndromes with thrombocytosis: reclassification of the cases by WHO proposals. *Leuk Res.* 2005 (4):365-70.

- Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA: Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006;108(10):3548-55.
- Ceesay MM, Lea NC, Ingram W.: The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia*. 2006;20(11):2060-1.
- Cermák J, Michalová K, Brezinová J, *et al.* A prognostic impact of separation of refractory cytopenia with multilineage dysplasia and 5q- syndrome from refractory anemia in primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2003;27(3):221-9.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373-83.
- Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol* 1994;47:1245-51.
- Chen TH, Walshauer M, Kambal A, Raju G, Walter MJ: Reduced HSPA9B Expression, a 5q31.2 Candidate Gene, in Primary Human CD34+ Cells Recapitulates Features of Ineffective Hematopoiesis Observed in MDS. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2007; 110: 116.
- Coller, H.A.; Bodyak, N.D. and Khrapko, K. (2002): Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* , 959, 434-447
- Craven SE, French D, Ye W, de Sauvage F, Rosenthal A. Loss of Hspa9b in zebrafish recapitulates the ineffective hematopoiesis of the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3528-34.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372-5.
- Della Porta MG, Kuendgen A, Malcovati L, Zipperer E, Pascutto C, Travaglino E, Maffioli M, Ambaglio I, Invernizzi R, Germing U, Cazzola M. Myelodysplastic Syndrome (MDS)-Specific Comorbidity Index for Predicting the Impact of Extra-Hematological Comorbidities on Survival of Patients with MDS. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), 2008; 112: 2677.
- Della Porta MG, Malcovati L, Travaglino E, Pascutto C, Maffioli M, Invernizzi R, Cazzola M. A Prognostic Model for Predicting the Impact of Comorbidities on Survival of Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2007; 110: 2453.
- Extermann M. Measurement and impact of comorbidity in older cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;35:181-200.
- Feinstein AR. The pretherapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J Chron Dis* 1970;23:455-68.

- Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 2007 Aug 16;448(7155):767-74. Review.
- Fuhler GM, Drayer AL, Olthof SG, Schuringa JJ, Coffey PJ, Vellenga E. Reduced activation of protein kinase B, Rac, and F-actin polymerization contributes to an impairment of stromal cell derived factor-1 induced migration of CD34+ cells from patients with myelodysplasia. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):359-68.
- Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R.: High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count >600x10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1334-5.
- Gattermann N, Aul C, Schneider W. Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA) *Br J Haematol*. 1990 Jan;74(1):45-52.
- Germing U, Gattermann N, Aivado M, Hilderbrandt B, Aul C. Two types of acquired idiopathic sideroblastic anaemia (AISA): a time-tested distinction. *Br J Haematol* 2000;108:724–8.
- Germing U, Strupp C, Kündgen A, Bowen D, Aul C, Haas R, Gattermann N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):905-10.
- Germing U. Myelodysplastische Syndrome: Epidemiologie, Reklassifizierung, Prognose und Therapie. 2002. Aachen: Shaker Verlag. ISBN: 3-8322-0067-3
- Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):5-10. Review.
- Giebel B, Corbeil D, Beckmann J, Höhn J, Freund D, Giesen K, Fischer J, Kögler G, Wernet P. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2332-8..
- Giebel B, Zhang T, Beckmann J, Spanholtz J, Wernet P, Ho AD, Punzel M. Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2146-52.
- Giebel B. Cell polarity and asymmetric cell division within human hematopoietic stem and progenitor cells. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(1-2):116-26. Review.
- Graubert TA, Payton MA, Shao J. Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis. : *PLoS One*. 2009. 4(2):e4583.
- Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, *et al*. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–88.

- Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol*. 2007;137(3):244-7.
- Haase D, Germing U, Schanz J *et al*. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4385-95
- Hamblin TJ. Just exactly how common is CLL? *Leuk Res*. 2009 Nov;33(11):1452-3.
- Harman, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300
- Harman, D. (2006): Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Sci*, 1067, 10-21
- Hoeijmakers JHJ DNA Damage, Aging, and Cancer . *N Engl J Med* 361:1475, October 8, 2009
- Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B, Kiladjian JJ, Varkonyi J, Antunovic P, Westwood NB, Arno MJ, Mohamedali A, Gaken J, Kontou T, Czepulkowski BH, Twine NA, Tamaska J, Csomer J, Benedek S, Gattermann N, Zipperer E, Giagounidis A, Garcia-Casado Z, Sanz G, Mufti GJ: The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia* 20 (2006): 1319-1321
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. WHO Classification of Tumours; Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: *IARC Press*; 2001.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, *et al*. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144–1148
- Jones AV, Kreil S, Zoi K. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2162-8.
- Jotterand Bellomo M, Parlier V, Muhlematter D, *et al*. Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;59(2):138–60.
- Kaul SC, Reddelb RR, Sugiharac T, *et al*. Inactivation of p53 and life span extension of human diploid fibroblasts by mot-2. *FEBS Lett*. 2000 Jun 2;474(2-3):159-64.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30:229–236
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, *et al*. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779–1790.
- Kralovics R, Teo SS, Li S: Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1377-80..

- Lasho TL, Pardanani A, McClure RF. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *Br J Haematol*. 2006 Dec;135(5):683-7.
- Le Beau MM, Albain KS, Larson RA *et al* Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol*. 1986 Mar;4(3):325-45.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, *et al*. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R *et al* DNA repair, genome stability, and aging., *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):497-512. Review.
- Lonergan T, Brenner C, Bavister B. Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol*. 2006 Jul;208(1):149-53.
- Lubke T, Monig SP, Schneider PM, Holscher AH, Bollschweiler E. Does Charlson-comorbidity index correlate with short-term outcome in patients with gastric cancer?. *Zentralbl Chir* 2003;128:970-6.
- Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, *et al*. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3538-45.
- Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3503-10.
- Marinos. E. Observations on the mitochondrial distribution in normal, rotated and cold-treated two-cell stage embryos of *Xenopus laevis*. *Cell Differ*. 18 (1986), pp. 163-171
- Matthes TW, Meyer G, Samii K, *et al*. Increased apoptosis in acquired sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* 2000;111:843-52.
- McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):168-71.

- Nilsson L, Astrand-Grundström I, Arvidsson I, *et al.* Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2012-21.
- Ohyashiki K, Aota Y, Akahane D: The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2359-60.
- Olsen RJ, Tang Z, Farkas DH.: Detection of the JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by melting curve analysis using the LightCycler system. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Jul;130(7):997-1003.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108:3472-3476
- Park MK, Ashby MC, Erdemli G, *et al.* Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J*. 2001 Apr 17;20(8):1863-74.
- Piccoli C, Ria R Scrima R *et al.*: Characterisation of Mitochondrial and Extramitochondrial Oxygen Consuming Reactions in Human Hematopoietic Stem Cells. *J Biol Chem* 2005, Vol. 280, No. 28, July 15:26467–26476.
- Piccirillo JF, Costas I. The impact of comorbidity on outcomes. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2004 Jul-Aug;66(4):180-5.
- Piccirillo JF, Feinstein AR. Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer. *Cancer*. 1996 Mar 1;77(5):834-42. Review.
- Pich A, Godio L. Refractory anaemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T) and JAK2(V617F) mutation transformed to acute myeloid leukaemia with chromosomal evolution including monosomy 7. *Leuk Res*. 2009 Sep 8. [Epub ahead of print]
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. : *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270
- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R *et al.* Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 18;275(1):174-9
- Remacha Af, Nomdedeu JF, Puget G.. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2006 May;91(5):719-20.

- Rivolta MN, Holley MC. Asymmetric segregation of mitochondria and mortalin correlates with the multi-lineage potential of inner ear sensory cell progenitors in vitro. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002 Jan 31;133(1):49-56.
- Rogers-Streeter R, Present CA, Reinhard E. Prognostic Significance of Thrombocytosis in Idiopathic Sideroblastic Anemia. *Blood* 1977 Sep;50(3):427-32.
- Sabin SL, Rosenfeld RM, Sundaram K, Har-el G, Lucente FE. The impact of comorbidity and age on survival with laryngeal cancer. *Ear Nose Throat J* 1999;78:578.
- Sanz GF, Sanz MA, Vallespí T, Cañizo MC, Torrabadella M, García S, Irriguible D, San Miguel JF. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood*. 1989 Jul;74(1):395-408.
- Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the predisposing mutations for JAK2-V617F. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):2022-7.
- Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):34-40.
- Schmitt-Graeff A, Thiele J, Zuk I, Kvasnicka HM. Essential thrombocythemia with ringed sideroblasts: a heterogeneous spectrum of diseases, but not a distinct entity. *Haematologica*. 2002 Apr;87(4):392-9.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Dengler R, Krober A, Kern W, *et al*. Detection of an MPLW515 mutation in a case with features of both essential thrombocythemia and refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis. *Leukemia*. 2007;22:453-555.
- Singh B, Bhaya M, Stern J, Roland JT, Zimble M, Rosenfeld RM, *et al*. Validation of the Charlson comorbidity index in patients with head and neck cancer: a multi-institutional study. *Laryngoscope* 1997;107:1469-75.
- Shaw Gr: Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(2):180-4.
- Shin MG, Kajigaya S, Tarnowka Met *al.*, Mitochondrial DNA sequence heterogeneity in circulating normal human CD34 cells and granulocytes. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4466-77.
- Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:1-10.

- Sokal G, Michaux JL, Van Der Berghe H, *et al.* Ferrant A, *et al.* A new hematologic syndrome with a distinct karyotype: the 5q- chromosome. *Blood* 1975;46:519.
- Solé F, Espinet B, Sanz GF, *et al.* Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. *Br J Haematol.* 2000 Feb;108(2):346-56.
- Solé F, Luño E, Sanzo C *et al.* Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2005 Sep;90(9):1168-78
- Sorrer ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, *et al.* Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005;106:2912-9.[
- Squirrell JM, Schramm RD, Paprocki AM, *et al.* Imaging mitochondrial organization in living primate oocytes and embryos using multiphoton microscopy. *Microsc Microanal.* 2003 Jun;9(3):190-201.
- Steensma DP, Caudill JS, Pardanani A: MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica.* 2006 Dec;91(12 Suppl):ECR57.
- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL: The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2005;106:1207–1209.
- Streeter RR, Presant CA, Reinhard E. Prognostic significance of thrombocytosis in idiopathic sideroblastic anemia. *Blood.* 1977 Sep;50(3):427-32.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, *et al.*, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: *IARC*;2008.
- Szpurka H, Tiu R, Murugesan.: Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood.* 2006 Oct 1;108(7):2173-81.
- Tamura H, Ogata K, Luo S. Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1998;103(3):778-84.
- Takano H, Ema H, Sudo K. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med.* 2004 Feb 2;199(3):295-302.
- Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, *et al.* Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *Clin Invest.* 2003 Nov;112(9):1351-60.

- Tefferi A, Thibodeau SN, Solberg LA Jr. Clonal studies in the myelodysplastic syndrome using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Blood*. 1990 May 1;75(9):1770-3.
- Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 361:1872, November 5, 2009
- Teofili L, Martini M, Cenci T: Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the 617F JAK-2 mutation. *Blood*. 2007 Mar 21.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51 Review.
- Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y, Sugimoto Y. Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1993 Aug;207(2):442-8.
- Wadhwa R, Takano S, Kaur K, *et al*. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2006 Jun 15;118(12):2973-80.
- Wang R, Gross CP, Halene S, Ma X. Comorbidities and survival in a large cohort of patients with newly diagnosed myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2009 Dec;33(12):1594-8.
- Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM.: Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1641-4.
- Wardrop D, Steensma DP. Is refractory anaemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T) a necessary or useful diagnostic category? *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(6):809-17.
- Wulfert M, Küpper AC, Tappich C, Bottomley SS, Bowen D, Germing U, Haas R, Gattermann N. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol*. 2008 May;36(5):577-86.
- Xie H, Hu Z, Chyna B, Horrigan SK, Westbrook CA. Human mortalin (HSPA9): a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on 5q31. *Leukemia*. 2000 Dec;14(12):2128-34.
- Yaguchi T, Aida S, Kaul SC, *et al* Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1100:306-11. Review.

- Yamamoto K, Nagata K, Tsurukubo Y, *et al.* A novel translocation t(3;22)(q21;q11) involving 3q21 in myelodysplastic syndrome-derived overt leukemia with thrombocytosis. *Leuk Res* 2000;24(5):453–7.
- Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, *et al.* Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett.* 2002 Apr 10;516(1-3):53-7.
- Zipperer E, Pelz D, Nachtkamp K, Kuendgen A, Strupp C, Gattermann N, Haas R, Germing U. The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2009 May;94(5):729-32.
- Zipperer E, Wulfert M, Germing U, Haas R, Gattermann N. MPL 515 and JAK2 mutation analysis in MDS presenting with a platelet count of more than 500 x 10⁹/l. *Ann Hematol.* 2008 May;87(5):413-5.

Publikationen und Kongreßbeiträge

Della Porta MG, Malcovati L, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Zipperer E, Travaglio E, Invernizzi R, Pascutto C, Lazzarino M, Germing U, Cazzola M Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome Haematologica. 2010 Dec 6. [Epub ahead of print]

Zipperer E, Pelz D, Nachtkamp K, Kuendgen A, Strupp C, Gattermann N, Haas R, Germing U: The hematopoietic stem cell transplantation comorbidity index is of prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome. Haematologica. 2009 May;94(5):729-32.

Zipperer E, Wulfert M, Germing U, Haas R, Gattermann N: MPL 515 and JAK2 mutation analysis in MDS presenting with a platelet count of more than $500 \times 10^9/l$. Ann Hematol 87 (5): 413-415, 2008.

Gattermann N, Billiet J, Kronenwett R, Zipperer E, Germing U, Nollet F, Criel A, Selleslag D: High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count $>600 \times 10^9/L$) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. Blood 109 (2007): 1334-1335.

Ingram W, Lea NC, Cervera J, Germing U, Fenaux P, Cassinat B, Kiladjian JJ, Varkonyi J, Antunovic P, Westwood NB, Arno MJ, Mohamedali A, Gaken J, Kontou T, Czepulkowski BH, Twine NA, Tamaska J, Csomer J, Benedek S, Gattermann N, Zipperer E, Giagounidis A, Garcia-Casado Z, Sanz G, Mufti GJ : The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. Leukemia 20 (2006): 1319-1321

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Berlin, Oktober 01.-05., 2010. JAK2 V617F and MPL W515L/K screening in patients with RARS-T and RCMD-RS. A single center study. (Poster-Präsentation)

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Mannheim, Oktober 2 - 6, 2009: Fluorescent microscopic analysis of the subcellular distribution of the mitochondrial protein Mortalin in CD34+ cells from MDS-patients and normal G-CSF mobilized CD34+ cells from apheresis products. Zipperer E, Shayegi N, Beckmann J, Fischer J, Haas R, Giebel B, Gattermann N (Poster-Präsentation).

Della Porta MG, Kuendgen A, Malcovati L, Zipperer E, Pascutto C, Travaglio E, Maffioli M, Ambaglio I, Invernizzi R, Germing U, Cazzola M. Myelodysplastic syndrome (MDS)-specific comorbidity index for predicting the impact of extra-hematological comorbidities on survival of patients with MDS. Blood (ASH annual meeting abstracts), Nov 2008; 112: 2677.

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Basel, Switzerland, Oktober 5 - 9, 2007: Mutation analysis of MPL 515 and JAK2 617 in patients with myelodysplastic syndromes classified as RARS-T (platelets $\geq 600.000/\mu l$) or RARS (with thrombocytosis between 500.000 and $600.000/\mu l$). Zipperer E, Wulfert M, Germing U, Haas R, Gattermann N (oral presentation; Onkologie, Suppl.3, Band 3, Oktober 2007)

9th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, Florence, Italy, May 16 - 19, 2007: JAK2 and MPL515 mutation analysis in RARS with platelets $\geq 500.000/\mu l$ and in RARS-T according to WHO (platelets ≥ 600.000). Zipperer E, Wulfert M, Germing U, Gattermann N (Poster-Präsentation 075; Leukemia Res 2007, 31, Suppl. 1, S80)

Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gattermann, herzlich dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe u.a im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1033 („Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“) arbeiten durfte, bei Herrn Prof. Dr. Haas dafür, dass ich diese Arbeit in seiner Klinik schreiben durfte.

Herrn Prof. Dr Schott danke ich ebenfalls für die Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.

Bei Herrn Prof. Dr. Germing und Herrn PD Dr. Giebel möchte ich mich ebenso für die Hilfestellungen und angeregte Diskussionen bedanken.

Monika Pooten, Sabrina Pechtel, Dr. Verena Schildgen und Dr. Michael Wulfert und allen weiteren Kollegen danke ich für die Einarbeitung und die gute Zusammenarbeit im hämatologischen Labor.

Liska Horsch, Julia Beckmann, Andre Görgens danke ich für die Einarbeitung im Labor der Transfusionsmedizin, für gute Laune und Verzweiflung zu jeglicher Tages- und Nachtzeit an 7 Tagen in der Woche.

Nicht zuletzt ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für viel Verständnis und Unterstützung während dieser Jahre.