

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Das Y-Box-bindende Protein 1 bei Myeloproliferativen Neoplasien und
Myelodysplastischen Syndromen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Kristin Beate Krausewitz

aus Heidelberg

Magdeburg 2023

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Krausewitz, Kristin Beate:

Das Y-Box-bindende Protein 1 bei Myeloproliferativen Neoplasien und Myelodysplastischen Syndromen. -2023.- 72 Bl., 20 Abb., 18 Tab., 4 Anl.

Kurzreferat

Einführung. Dem Y-Box-bindenden Protein 1 (YBX1) kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Malignome zu. Über seine Rolle im Rahmen maligner hämatopoetischer Erkrankung ist bisher allerdings wenig bekannt. **Ziel.** Evaluation der YBX1-Expression im Knochenmark bei myeloproliferativen Neoplasien (MPN), myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuten myeloischen Leukämien (AML). **Methoden.** Immunhistochemischer YBX1-Nachweis und semiquantitative Evaluation der Expression mittels IRS-Score nach Remmele bei 89 MPN-, 61 MDS- und 50 AML-Fällen im Vergleich zu einer unauffälligen Kontrollgruppe (n=32) und im Vergleich zu 12 Fällen mit der Diagnose Immunthrombozytopenie (ITP). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese gelegt. **Ergebnisse.** Es liegt eine deutliche YBX1-Überexpression in den Megakaryozyten bei den BCR-ABL-negativen MPN vor ($p < 0,001$). Die ITP weist ein ähnliches YBX1-Expressionsniveau auf ($p 0,302$). In den Zellen der übrigen Hämatopoese konnte lediglich bei der Polycythaemia vera (PV) eine signifikante Überexpression nachgewiesen werden ($p 0,004$). Im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) ist immunhistochemisch keine vermehrte YBX1-Expression nachweisbar (Megakaryozyten $p 0,253$ bzw. übrige Hämatopoese $p 0,379$). Im Rahmen der MDS und der AML kommt es ebenfalls zu einer signifikanten YBX1-Erhöhung (Megakaryopoese: MDS $p 0,007$, AML $p 0,032$, übrige Hämatopoese: MDS $p < 0,001$, AML $p < 0,001$). **Schlussfolgerung.** Im Rahmen der BCR-ABL-negativen MPN, des MDS und der AML ist die YBX1-Expression im Knochenmark erhöht. Allerdings ist diese Expression offenbar nicht spezifisch für hämatopoetische Malignome.

Schlüsselwörter

YBX1, MPN, MDS, AML

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|---------------|
| 1. EINFÜHRUNG | - 1 - |
| 1.1. Übersicht Knochenmarkerkrankungen | - 1 - |
| 1.2. Myeloproliferative Neoplasien (MPN) | - 2 - |
| 1.2.1. Chronische myeloische Leukämie (CML) | - 3 - |
| 1.2.2. BCR-ABL-negative MPN | - 4 - |
| 1.3. Myelodysplastische Syndrome (MDS) | - 7 - |
| 1.4. Das Y-Box-bindende Protein 1 (YBX1) | - 9 - |
| 1.4.1. Aufbau und Struktur | - 10 - |
| 1.4.2. Funktion | - 11 - |
| 1.4.3. YBX1 und maligne Erkrankungen | - 14 - |
| 1.4.4. YBX1 und Hämatopoese | - 16 - |
| 1.5. Fragestellung der Arbeit | - 17 - |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | - 18 - |
| 2.1. Patientenkollektiv und Studiengruppen | - 18 - |
| 2.2. Reagenzien | - 19 - |
| 2.3. Geräte | - 20 - |
| 2.4. Immunhistochemie | - 21 - |
| 2.4.1. YBX1-Antikörper | - 21 - |
| 2.4.2. Färbeverfahren | - 22 - |
| 2.5. Histologische Auswertung | - 23 - |
| 2.6. Datenanalyse | - 25 - |
| 3. ERGEBNISSE | - 27 - |
| 3.1. Analyse des Patientenkollektivs | - 27 - |
| 3.2. Statistische Auswertung | - 28 - |
| 3.2.1. Myeloproliferative Neoplasien (MPN) | - 28 - |
| 3.2.2. Myelodysplastische Syndrome (MDS) | - 38 - |
| 3.2.3. Akute myeloische Leukämie (AML) | - 40 - |
| 4. DISKUSSION | - 43 - |
| 4.1. Diskussion des Patientenkollektivs und des Materials | - 48 - |
| 4.2. Diskussion der immunhistochemischen YBX1-Reaktion | - 49 - |
| 4.3. Diskussion der histologischen Auswertung | - 50 - |
| 4.4. Diskussion der statistischen Auswertung | - 52 - |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | - 53 - |
| 6. ANHANG | - 54 - |
| 6.1. Literaturverzeichnis | - 54 - |
| 6.2. Danksagung | - 70 - |
| 6.3. Ehrenerklärung | - 71 - |
| 6.4. Darstellung des Bildungsweges | - 72 - |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| ABC-Methode | Avadin-Biotin-Komplex-Methode |
| Akt | Serin/Threonin-Kinase (Proteinkinase B) |
| ALIP | Atypisch lokalisierte immature Vorläuferzellen |
| AML | Akute Myeloische Leukämie |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| ASXL1 | Additional Sex Combs-Like 1 |
| B/A-Repeats | Base/Acid-Repeats |
| BCR-ABL | Breakpoint Cluster Region - Abelson-Tyrosin-Kinase |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CALR | Calretikulin |
| CD95/APO-1 | Todesrezeptor Fas |
| CEL | Chronische Eosinophilenleukämie |
| (a)CML | (atypische) Chronische myeloische Leukämie |
| CMML | Chronische myelomonozytäre Leukämie |
| c-myc | MYC Protoonkogen Proteine, Transkriptionsfaktor |
| CNL | Chronische Neutrophilenleukämie |
| CSA-Methode | Catalyzed Signal Amplification Methode |
| CRS | Cytoplasmic Retention Site |
| CSD | Cold Shock Domain |
| CspA | Cold Shock Protein A |
| CTD | C-terminale Domäne |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| DNMT3A | DNA-Methyltransferase 3A |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| EMT | Epithelial-mesenchymale Transition |
| ET | Essenzielle Thrombozythämie |
| Fas | Todesrezeptor Fas (CD 95/ APO-1) |
| FFPE | Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue |
| FI | Färbeintensität |
| GATA | Transkriptionsfaktor |

| | |
|--|--|
| GZ | Punkte, abhängig von Anzahl gefärbter Zellen |
| hnRNP A1 | heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A1 |
| Hb | Hämoglobin |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| H2O2 | Wasserstoffperoxid |
| IDH | Isocitrat-Dehydrogenase |
| Ig | Immunglobulin |
| IKBKE | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon |
| (R-)IPSS | (Revised) International Prognostic Scoring System |
| IRS | Immunreaktiver Score |
| ITP | Immunthrombozytopenie |
| JAK | Januskinase |
| JH-2 | Katalytisch inaktive Pseudokinasedomäne der Januskinase |
| JMML | Juvenile myelomonozytäre Leukämie |
| LSAB-Methode | Labelled Streptavidin Biotin Methode |
| LSC | Leukemic Stem Cells |
| MAPK/ERK | Mitogen-aktivierende Proteinkinase/extrazelluläre signalregulierende Kinase |
| MDS(-RA), (-RS), (-SLD), (-MLD), (-EB), (-U) | Myelodysplastisches Syndrom (-Refraktäre Anämie), (-Ringsideroblasten), (-single lineage dysplasia), (-multilineage dysplasia), (-excess of blasts), (-unclassified) |
| MDS/MPN-RS-T | MDS/MPN mit Ringsideroblasten und Thrombozytose |
| MDS/MPN-U | MDS/MPN-unklassifizierbar |
| MET-Gen | Mesenchymale-epidermale Transition, Rezeptortyrosinkinase-Gen (HGF-Rezeptor) |
| MF | Myelofibrose |
| MHC-II | Major Histocompatibility Complex II |
| MMP-2 | Matrix-Metalloprotease-2 |
| MPD | Myeloproliferative Disorders |
| MPL | Myeloproliferative Leukämie |
| MPN | Myeloproliferative Neoplasie |
| mTor | Mechanistic Target of Rapamycin |

| | |
|----------------------|---|
| MYC | MYC Protoonkogen, Transkriptionsfaktor |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NLS | nuclear localization signal |
| NPMc | Nucleophosmin-cytoplasmic |
| NTD | N-terminale Domäne |
| p53 | p53-Protein (Tumorsuppressorgen) |
| PBS | Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| (q)PCR | (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | Pondus hydrogenii, Potential des Wasserstoffs |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PMF | Primäre Myelofibrose |
| post-ET-MF | Post-essenzielle Thrombozythämie-Myelofibrose |
| post-MPN-AML | Post-Myeloproliferative Neoplasie-Akute myeloische Leukämie |
| post-PV-MF | Post-Polycythaemia vera-Myelofibrose |
| PV | Polycythaemia vera |
| RabMAb | Rabbit Monoclonal Antibody Products |
| (m)RNA | (messenger) Ribonucleic Acid |
| (m)RNP | (messenger) Ribonucleoprotein |
| RUNX1 | Runt-related Transcription Factor 1 |
| SF3B1 | Splice-Faktor 3b, Untereinheit 1 |
| SRSF2 | Serine/Arginine-rich Splicing Factor 2 |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| T-ALL | Akute lymphatische Leukämie, der T-Zellreihe |
| TET2 | Tet methylcytosine dioxygenase 2 |
| VEGF(-A) | Vascular Endothelial Growth Factor (A) |
| WHO | World Health Organization |
| YBX1/2/3, YB-1/-2/-3 | Y-Box-bindendes Protein 1/2/3 |

1. Einführung

1.1. Übersicht Knochenmarkerkrankungen

Der Ort der Hämatopoese im menschlichen Körper ist das Knochenmark (1). Beim Erwachsenen sind die hämatopoetischen Zellen insb. im Axialskelett und in den proximalen Anteilen der langen Röhrenknochen lokalisiert (2, 3). Die Hämatopoese wird in die Myelo- und die Lymphopoese unterteilt (4). Im Knochenmark finden sich neben den hämatopoetischen Stammzellen verschiedene Reifestufen der myeloischen Zellreihen sowie Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen (2, 3). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Myelopoese, zu der Erythro-, Granulo-, Monozyto- und Megakaryopoese zählen (4).

Zu diagnostischen Zwecken wird Knochenmark bevorzugt der posterioren Crista iliaca durch Biopsie oder Aspiration entnommen (5). Bei der Diagnostik von Knochenmarkerkrankungen kommt in Deutschland der interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Hämatologen und Pathologen eine entscheidende Rolle zu. Die Durchführung einer Knochenmarkhistologie durch den Pathologen wird meist empfohlen, da sie neben den von Hämatologen erhobenen Befunden zusätzliche Informationen liefert oder bei Punctio sicca eine Alternative zur Aspiration darstellt (6). Durch die Knochenmarkhistologie ist neben der Beurteilung der Markzellularität und der anteiligen Zellreihen bzw. Reifungsstufen auch eine Untersuchung der knöchernen Bestandteile sowie der Markraumarchitektur und des Fibrosegrades bzw. der Stromazusammensetzung möglich (2, 7). Immunhistochemische, zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen können ebenfalls anhand eines Knochenmarkbioptats erhoben werden (6). Zur genauen histologischen Beurteilung der Markzellularität, welche physiologisch mit zunehmendem Lebensalter abnimmt, sollten mindestens drei intakte intratrabekuläre Markräume erfasst sein (8, 9). Im normalen Knochenmark sind die myeloischen Vorstufen in der Regel perivaskulär und peritrabekulär zu finden (2). Bei der Granulopoese findet eine Differenzierung von markraumperipher nach markzentral statt (2, 3). Die Erythropoese ist in diffus verteilten, markzentralen, erythroiden Inseln angeordnet (2, 3). Ebenfalls markraumzentral, bevorzugt perisinusoidal, liegen Megakaryozyten und ihre Vorläuferzellen (2, 3). Die vom Pathologen durchgeführte Knochenmarkhistologie ist ein Teilaspekt und kann nur unter Zusammenschau der Befunde vollständig gedeutet werden. Das Knochenmarkaspirat wird i.d.R. durch den Hämatologen zytomorphologisch, immunzytometrisch, zytogenetisch und molekularbiologisch

untersucht (6, 10). Auch das klinische Bild sowie Blutbild bzw. Differenzialblutbild und die Ergebnisse des peripheren Blutausstrichs werden i.d.R. vom Hämatologen erhoben (6, 10).

Veränderungen der Knochenmarkzellularität oder -architektur können u.a. im Rahmen nutritiv-toxischer Störungen, Infektionen oder im Rahmen maligner Knochenmarkerkrankungen wie den myeloproliferativen Neoplasien (MPN), den myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder der akuten myeloischen Leukämie (AML) auftreten (2). Die Veränderungen können alle oben genannten zellulären Bestandteile des Knochenmarks betreffen. Typisch für nutritive Störungen wie Vitamin B12- oder Folsäuremangel sind eine Hyperplasie, Linksverschiebung und megaloblastische bzw. makroblastäre Veränderungen der Erythropoese (2). Medikamente wie Metamizol oder Valproinsäure führen ebenfalls zu Knochenmarkveränderungen, oft mit Reifungsstopp oder Aplasie einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen (2, 11, 12). Durch bakterielle Infektionen kommt es zur granulopoetischen Hyperplasie mit Linksverschiebung (2). Eine Immunthrombozytopenie (ITP), bei der es sich um eine erworbene Erkrankung mit vermehrtem peripheren Auto-Antikörper-vermitteltem Thrombozytenabbau handelt, resultiert in einer Steigerung einer i.d.R. normalen Megakaryopoese im Knochenmark (2, 13). Auf die Veränderungen im Rahmen der malignen Knochenmarkerkrankungen soll im Folgenden am Beispiel der MPN und der MDS genauer eingegangen werden.

1.2. Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Die MPN sind durch monoklonale, autonome Proliferation einer oder mehrerer pluripotenter Stammzellen des Knochenmarks mit entsprechend vermehrtem Auftreten der jeweiligen Zellreihe im peripheren Blut gekennzeichnet (14, 15). Die chronische myeloische Leukämie (CML), die Polycythaemia vera (PV), die essenzielle Thrombozythämie (ET) und die primäre Myelofibrose (PMF) wurden erstmals 1951 durch William Dameshek anhand knochenmarkmorphologischer und klinischer Gemeinsamkeiten unter dem Begriff „Myeloproliferative Disorders“ (MPD) subsummiert (16, 17). Seit 2016 werden laut WHO zusätzlich die chronische Neutrophilen-Leukämie (CNL) sowie die chronische Eosinophilen-Leukämie (CEL) zu den MPN gezählt (18). Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf die vier ursprünglichen Krankheitsbilder von Dameshek gelegt.

1.2.1. Chronische myeloische Leukämie (CML)

Bei der CML dominiert die klonale Proliferation der granulozytären Zellreihe (19). Die Inzidenz liegt bei ca. 1,5/100.000 Einwohner im Jahr (20, 21). Männer sind häufiger betroffen (20, 21). Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 55 und 65 Jahren (21). Zugrunde liegt das sogenannte Philadelphia-Chromosom (22, 23), bestehend aus den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (24). Durch reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) entsteht das BCR-ABL1-Fusionsgen (24, 25). Die konstitutive Kinaseaktivierung führt zu einer abnormalen, hämatopoetischen Proliferation mit Transformation zur CML (26–29). Es werden eine chronische und eine akzelerierte Phase sowie die Blastenkrise unterschieden (18). Die häufigsten Beschwerden sind Fatigue und Lethargie, gefolgt von Blutungen, B-Symptomatik und Oberbauchbeschwerden (30, 31). Die Diagnose kann anhand des typischen Befundes im peripheren Blut mit Leukozytose, pathologischer Linksverschiebung, Basophilie, meist gemeinsam mit Eosinophilie und dem Nachweis des Philadelphia-Chromosoms bzw. der BCR-ABL-Mutation gestellt werden (18, 32). Ein Knochenmarkaspirat ist zur Phasenbestimmung und Karyotypisierung essenziell (18). In Tabelle 1 sind die WHO-Diagnosekriterien der CML aufgeführt (18). Die Durchführung einer Knochenmarkhistologie wird insb. bei insuffizienter Aspiration durch vermehrte Faserbildung empfohlen (6).

| Chronische myeloische Leukämie (CML), BCR-ABL 1+ |
|--|
| Chronische Phase |
| < 10 % Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark |
| Akzelerierte Phase |
| Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein (hier nicht aufgeführt: drei weitere, vorläufige Kriterien, die abhängig vom Ansprechen auf eine Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie sind) |
| 1. Anhaltende oder zunehmende Leukozytose ($> 10 \times 10^9/L$), therapieresistent |
| 2. Persistierende oder zunehmende Splenomegalie, therapieresistent |
| 3. Anhaltende Thrombozytose ($> 1000 \times 10^9/L$), therapieresistent |
| 4. Anhaltende Thrombozytopenie ($< 100 \times 10^9/L$), therapieunabhängig |
| 5. ≥ 20 % Basophile im peripheren Blut |
| 6. 10-19 % Blasten im peripheren Blut und/oder Knochenmark |
| 7. Zusätzliche klonale Chromosomenabnormalitäten zum Diagnosezeitpunkt (neben Philadelphia-Chr. (Ph): zweites Ph, Trisomie 8/19, Isochromosom 17q, komplexer Karyotyp, abnormales 3q26.2) |
| 8. Neue klonale Chromosomenabnormalitäten, die während der Therapie auftreten |
| Blastenkrise |
| ≥ 20 % Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark |
| Extramedulläre Blastenproliferation |

Tabelle 1: WHO-Diagnosekriterien der BCR-ABL-positiven CML 2016 (18)

In der chronischen Phase der CML liegt i.d.R. ein hyperzellulärer Befund mit insb. gesteigerter Granulopoese vor (19, 33). Es sind unterschiedliche Reifungsstufen, meist reduzierte Adipozyten, und eine variable Markfibrose zu finden (19, 33). Typisch sind außerdem kleine, nicht dysplastische, über den Markraum verteilte Megakaryozyten mit hypolobulierten Zellkernen (33, 34). Der Blastenanteil liegt unter 10 % (18, 19). Die akzelerierte Phase ist durch eine weitere Zunahme der Hyperzellularität und durch dysplastische Veränderungen, einen erhöhten Blastenanteil (10-19 %) und abnormale, megakaryozytäre Cluster gekennzeichnet (33). Bei einer Blastenkrise liegt der Blastenanteil bei mindestens 20 % (18).

1.2.2. BCR-ABL-negative MPN

Zu den BCR-ABL-negativen MPN zählen die PV, die ET und die PMF (16, 17). Die Inzidenzen der PV und der ET variieren in der Literatur stark mit 0,02-2,8/100.000 (35, 36) bzw. 0,59-2,53/100.000 (35). Die PMF hat lediglich eine Inzidenz von 0,3-0,5/100.000 (37). Das mediane Erkrankungsalter der PV liegt zwischen 60 und 70 Jahren (35, 36) und das der ET zwischen 65 und 70 Jahren (35). Das mittlere Erkrankungsalter der PMF beträgt 60 bis 65 Jahre (14, 37).

Im Vordergrund der PV steht die Erythropoetin-unabhängige Erythropoese (38–40). Neben der peripheren Erythrozytose kann es ebenfalls zu einer Thrombo- und Leukozytose kommen (33, 14). Bei der ET steht eine Zytokin-unabhängige Proliferation besonders der megakaryozytären Zellreihe mit einer peripheren Thrombozytose im Vordergrund (41–43). Die PMF zeichnet sich durch eine gestörte Hämatopoese aus, meist einhergehend mit Anämie, Splenomegalie und Leukozytose aus (18, 44). Im Verlauf kommt es zu einer progredienten Knochenmarkfibrose mit Panzytopenie und Leukoerythroblastose (18). Es werden ein präfibrotisches und ein fibrotisches Stadium unterschieden (18). Die PV und die ET können im Krankheitsverlauf ebenfalls in eine Myelofibrose übergehen (45, 46). Auch bei der Pathogenese der BCR-ABL-negativen MPN kommen Genmutationen eine entscheidende Rolle zu. Die größte Bedeutung wird der JAK2-Mutation zugerechnet. Diese liegt bei ca. 96 % der PV-, 65 % der PMF- und bei 55 % der ET-Fälle vor (47, 48). Bei der am häufigsten auftretenden JAK2(V617F)-Mutation handelt es sich um eine erworbene Guanin-zu-Thymin-Punktmutation des Nucleotids 1846 im Exon 12 auf Chromosom 9p24 (48). Valin wird durch Phenylalanin an Position 617 der JH2-Pseudo-Kinase-Domäne der Januskinase 2 ersetzt, welche so ihre autoinhibitorische Wirkung verliert (48–50). Dies resultiert in einer Zytokin-Hypersensitivität und Zytokin-unabhängigen Proliferation der hämatopoetischen Zellen (48–50). Die JAK2(V617F)-Mutation induziert bei Mäusen MPN-ähnliche Krankheitsbilder (48, 51). Weitere häufige Mutationen im Rahmen der ET und der PMF

sind die MPL- und CALR-Mutation (45, 52-54). MPL-Mutationen sind bei 3 % der ET (52) und 7 % der PMF-Fälle (53) vorhanden. CALR-Mutationen treten in 30 % der ET- (45) und in 35 % der PMF-Fälle (54) auf. Beide Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs (55, 56). Den Genmutationen kommt zusätzlich eine prognostische Bedeutung zu (46, 57, 58). Neben den genannten häufigen Mutationen gibt es viele weitere; Beispiele sind die TET2- (59), die ASXL1- (60) sowie die IDH1/IDH2-Mutation (61), die im Zusammenhang mit den MPN stehen.

Die Klinik der PV, der ET sowie der präfibrotischen MF ist geprägt durch thromboembolische Ereignisse und vaskuläre Komplikationen wie Blutungen (41, 62). Nicht selten handelt es sich bei einem thromboembolischen Ereignis um eine MPN-Erstmanifestation (36). Bei 68,2 % der PV-Patienten tritt außerdem ein aquagener Pruritus auf (63). Im weiteren Krankheitsverlauf der PMF bzw. im Rahmen einer post-PV/ET-MF kommt es zu progressiver Zytopenie, Kachexie und Gewichtsverlust, begleitet von konstitutionellen Symptomen (insb. Fatigue) und Splenomegalie (62). Etwa die Hälfte der Patienten leidet an Mikrozirkulationsstörungen in Form von Taubheit, Kopfschmerzen oder Schwindel (62). Abdominelle Schmerzen oder Unwohlsein treten bei Patienten mit PMF wesentlich häufiger auf als bei Patienten mit PV oder ET (62).

Diagnostisch kommt neben Anamnese, körperlicher Untersuchung und Laborbefund insb. der Knochenmarkhistologie eine entscheidende Rolle zu. Sie wird zu den WHO-Hauptkriterien gezählt (s. Tabelle 2) (18). Bei der PV zeigt sich knochenmarkhistologisch eine trilineäre Hyperzellularität mit polymorpher Megakaryopoese (18, 33). Die Erythropoese ist meist linksverschoben mit vergrößerten, bis in die Markraumperipherie reichenden Zellnestern (33). Das Speichereisen ist im Krankheitsverlauf in den Makrophagen reduziert (33). Bei der ET kommt es hauptsächlich zu einer Zunahme der Megakaryopoese mit vergrößerten, reifen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Nuclei (18, 33). Die Megakaryopoese ist über die Markräume verteilt und bildet in Abgrenzung zur PMF i.d.R. keine Cluster (33). Meist sind Granulo- und Erythropoese weder signifikant vermehrt noch linksverschoben (18, 33). In seltenen Fällen kann es zu einer leichten Myelofibrose kommen (33). Im frühen, präfibrotischen Stadium der PMF ist das Knochenmark noch hyperzellulär (18, 33). Dominierend sind meist eine linksverschobene Granulopoese und Megakaryopoese bei zum Teil leicht reduzierter, linksverschobener Erythropoese (18, 33). Es sind charakteristische Veränderungen der Megakaryopoese zu erkennen. Sie ist in dichten Clustern bis in die Markraumperipherie angeordnet (33). Innerhalb der Cluster variiert die Größe der Zellen stark und sie weisen auffällige Kernformationen wie Wolkenkerne und nackte Kerne auf (33). Mit Fortschreiten der Erkrankung zum fibrotischen Stadium nimmt die Zellularität ab, die Zellreihen werden zunehmend dysplastisch und es kommt zur zunehmenden

Fibrose und endostalen Knochenneubildung (18, 33). Die histologische Einteilung der Myelofibrosegrade 0-3 ist Tabelle 3 zu entnehmen (9). Ein weiteres wichtiges diagnostisches Werkzeug ist die molekulargenetische Untersuchung auf die oben genannten häufig vorkommenden Mutationen. Die diagnostischen Kriterien der WHO sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| | PV | ET | PMF |
|-------------------------------|--|--|--|
| Bedingung | Alle 3 Hauptkriterien oder die ersten beiden Hauptkriterien und das Nebenkriterium | 4 Hauptkriterien oder die ersten 3 Hauptkriterien und das Nebenkriterium | 3 Hauptkriterien und mindestens ein Nebenkriterium |
| Hauptkriterien | | | |
| Labor | Hb > 16,5 g/dl ♂; Hb > 16,0 g/dl ♀ oder Hkt > 49 % ♂; > 48 % ♀ oder RCM (red cell mass) > 25 % über Normwert | Thrombozyten $\geq 450 \times 10^9/L$ | |
| Knochenmark-biopsie | Trilineäre Hyperzellularität (Panmyelosis) mit pleomorphen, reifen Megakaryozyten (Größenunterschiede) | Hauptsächlich Proliferation der Megakaryozytenlinie mit vermehrten, vergrößerten, reifen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Nuclei, kein sign. Anstieg/Linksverschiebung der Neutrophilen-Granulopoese oder Erythropoese, selten geringe Zunahme (Grad 1) der Retikulinfasern | <u>Präfibrotisches Stadium</u> Proliferation und Atypie der Megakaryozyten; ohne retikuläre Fibrose > Grad 1; erhöhte altersabhängige Zellularität; Granulozytenproliferation; häufig erniedrigte Erythropoese <u>Fibrotisches Stadium:</u> Proliferation und Atypie der Megakaryozyten mit retikulärer und/oder Kollagenfibrose Grad 2/3 |
| Sonstiges | | Entspricht nicht den WHO-Kriterien der BCR-ABL1+ CML, PV, PMF, MDS oder anderer myeloischer Neoplasien | Entspricht nicht den WHO-Kriterien der BCR-ABL1+ CML, PV, ET, MDS oder anderer myeloischer Neoplasien |
| Mutationsstatus/ Sonstiges | JAK2V617F- oder JAK2 Exon 12-Mutation | JAK2, CALR, MPL Mutation | JAK2, CALR, MPL Mutation oder anderer klonaler Marker (z.B. ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/2, SRSF2, SF3B1) oder Abwesenheit reaktiver, retikulärer Knochenmarkfibrose |
| Nebenkriterien | Subnormaler Serum-Erythropoetinspiegel <u>Besonderheit:</u> Bei absoluter Erythrozytose (♂Hb>18,5 g/dl/Hkt>55,5% ♀Hb>16,5 g/dl/Hkt>49,5%) und Erfüllung aller anderen Kriterien kann auf Knochenmarkbiopsie verzichtet werden | Nachweis eines klonalen Markers oder Ausschluss einer reaktiven Thrombozytose | Erfüllung eines der folgenden Kriterien in zwei aufeinanderfolgenden Bestimmungen: a) Anämie, welche nicht einer komorbiden Situation geschuldet ist b) Leukozytose $\geq 11 \times 10^9/L$ c) Palpable Splenomegalie d) LDH oberhalb des oberen Normwerts e) Leukoerythroblastose (nur bei fibrotischem Stadium) |

Tabelle 2: WHO-Diagnosekriterien der BCR-ABL-negativen MPN 2016 (modif. nach 18)

| | |
|------|---|
| MF-0 | Zerstreutes, lineares Retikulin ohne Überkreuzungen (crossovers), wie physiologisches Knochenmark |
| MF-1 | Loses Retikulin-Netzwerk mit vielen, insb. perivaskulär gelegenen Überkreuzungen |
| MF-2 | Diffuse, dichte Retikulin-Zunahme mit vielen Überkreuzungen, gelegentlich mit fokalen, dicken Kollagenfaserbündeln und/oder fokaler Osteosklerose |
| MF-3 | Diffuse, dichte Retikulin-Zunahme mit massiver Überkreuzung, mit groben Bündeln dicker Kollagenfasern, meist mit signifikanter Osteosklerose assoziiert |

Tabelle 3: Myelofibrosegrade (MF 0-3) (modif. nach 9)

Die ET hat eine sehr gute Prognose ohne signifikante Reduktion der Lebenserwartung (64). Bei der PV ist die Lebenserwartung mit einer 1,6-fach gesteigerten Mortalitätsrate hingegen etwas reduziert (64). Hauptrisikofaktor sind thromboembolische Ereignisse, die bei der ET deutlich seltener auftreten als bei der PV (64). Zu den negativen Prognosefaktoren der ET zählen stattgehabte Blutungen oder thromboembolische Komplikationen, ein Alter von über 60 Jahren und eine Thrombozytenzahl von über 1.500.000/ μ l (65–67). Die massive Thrombozytose ist aufgrund eines erworbenen von-Willebrand-Syndroms mit einem erhöhten Blutungsrisiko assoziiert (66). Bei Vorliegen bereits eines Risikofaktors wird der Patient in die Hoch-Risiko-Gruppe eingestuft (65). Die Lebenserwartung und die Lebensqualität von PMF-Patienten ist bedeutend schlechter (47). Die mediane Überlebenszeit beträgt durchschnittlich 69 Monate (68). Die MPN können im Krankheitsverlauf in eine AML übergehen (69). Sie ist für ca. 7,2 % der Todesfälle verantwortlich (70). Die AML-Inzidenz ist bei der PMF höher als bei der ET und der PV, welche im Verlauf jedoch auch in eine Myelofibrose übergehen können (71).

1.3. Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Bei den MDS werden eine primäre und eine therapieassoziierte Form unterschieden. Chemotherapeutika (72) wie z.B. Alkylantien oder Topoisomerase 2-Hemmer (73) und Radiatio (72) können ein MDS induzieren. Der Kontakt zu benzolhaltigen Stoffen (74) oder zu radioaktiver Strahlung (75) wurden ebenfalls als Risikofaktor beschrieben. Die primäre Form tritt durchschnittlich 20 Jahre später auf als die therapieassoziierte Variante (76). Laut Düsseldorfer MDS-Register hat das MDS eine Inzidenz von 4-5/100.000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer häufiger betroffen sind (76). Männer erkranken früher als Frauen (medianes Erkrankungsalter: Männer 71 Jahre, Frauen 75 Jahre, 76).

Die WHO teilt die MDS-Subtypen in Abhängigkeit von den morphologischen Dysplasien der hämatopoetischen Zellreihen, der peripheren Zytopenie, dem vorhandenen Karyotyp sowie einer vorhandenen SF3B1-Mutation ein (18). Es werden die MDS mit unilineärer (MDS-SLD), oder multilineärer Dysplasie (MDS-MLD), mit Ringsideroblasten (MDS-RS), mit isolierter del(5q), mit Blastenexzess (MDS-EB) und die nicht klassifizierbaren MDS-Formen (MDS-U) unterschieden (18). Neben dem Blutbild und der Bestimmung des Blastenanteils im Blutaussstrich, der zytologischen Beurteilung von Knochenmarkaspirat und der zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchung ist die Knochenmarkhistologie von Bedeutung (18). Sie kann zur Abschätzung der altersabhängigen Zellularität, des Blastenanteils, der Fibrose sowie zum Nachweis abnormal lokalisierter unreifer Vorstufen, welche häufig mit aggressiven MDS-Formen assoziiert sind, genutzt werden (77, 78). Außerdem ist sie zum Beispiel bei bestehender Fibrose (Punctio sicca) der Zytologie überlegen (77). Zur Diagnosestellung sollten Dysplasiezeichen in mindestens 10 % einer oder mehrere Zellreihen nachgewiesen werden (18, 79). Häufig liegt ein hyperzelluläres Knochenmark mit atypisch lokalisierter, hyperplastischer Erythro- und Megakaryopoese sowie hypoplastischer, hypogranulierter, linksverschobener Granulopoese vor (79). Die meist makroblastischen, erythropoetischen Vorläuferzellen bilden Gruppen gleicher Reifegrade mit atypischen Kernformationen und teilweise Ringsideroblasten (79). Die polymorphe Megakaryopoese, oft in lockeren Clustern angeordnet, zeichnet sich häufig durch kleine, hypolobulierte oder getrennte Kerne aus (79). Unreife Myeloblasten enthalten Nucleolen mit oder ohne Granula (79). Nester atypisch lokalisierter Vorläuferzellen (ALIP) können noch im Markraumzentrum nachgewiesen werden (79). Der Karyotyp hat Einfluss auf die Prognose des MDS. Bei normalem Karyotyp konnte eine mediane Überlebenszeit von 53 Monaten festgestellt werden, wohingegen diese bei komplexen Anomalien bei nur etwa neun Monaten liegt (80). Die in Tabelle 4 aufgeführten Chromosomenanomalien sind von diagnostischer und prognostischer Bedeutung (80). Auch das Vorkommen somatischer Genmutationen hat unterschiedliche Effekte auf die Zytopenie, die Blastenproliferation und das Gesamtüberleben (81, 82). Sie sind bei ca. 90 % der MDS-Patienten nachweisbar (82). Die häufigsten Mutationen liegen in sechs Genen: TET2-, SF3B1-, ASXL1-, SRSF2-, DNMT3A- und RUNX1-Gen (82). Eine diagnostische Besonderheit kommt dabei SF3B1-Genmutationen, welche mit dem Auftreten von Ringsideroblasten (MDS-RS) assoziiert sind, zu (18, 83, 84).

Die klinische Symptomatik wird durch die Folgen der Zytopenien bestimmt. Meist steht dabei die Anämiesymptomatik mit Müdigkeit, Schwäche, Blässe, Dyspnoe oder Palpitationen im Vordergrund. Durch Leuko- und Thrombopenie kann es außerdem zu Infektanfälligkeit und Blutungskomplikationen kommen (85, 86). Im Durchschnitt gehen 20-30 % der MDS in eine AML

über (85, 87, 88). Bei der AML kommt es durch genetische Aberrationen zur unkontrollierten Proliferation eines malignen, myeloischen Klons mit Nachweis von $\geq 20\%$ unreifer Blasten im Knochenmark und/oder im peripheren Blut (89, 90). Anhand des R-IPSS können fünf Risikogruppen beim MDS mit zunehmendem Risiko für eine AML-Transformation und Mortalität unterschieden werden (91). In den Score fließen neben den zytogenetischen Veränderungen das Ausmaß der Zytopenie (Hb, Thrombozyten, neutrophile Granulozyten) und die Anzahl der Blasten im Knochenmark ein (91).

Neben der beschriebenen Unterscheidung in MPN und MDS gibt es Krankheitsbilder, die bei initialer Präsentation sowohl proliferative als auch dysplastische Merkmale aufweisen (18, 92). Diese werden den MDS/MPN Overlap Syndromen zugeordnet (18). Unter diesem Begriff werden in der aktuellen WHO-Klassifikation die folgenden fünf Krankheitsbilder zusammengefasst: aCML (atypische (BCR-ABL1-negative) CML), CMML (chronische myelomonozytäre Leukämie), JMML (juvenile myelomonozytäre Leukämie), MDS/MPN-RS-T (MDS/MPN mit Ring-sideroblasten und Thrombozytose) und MDS/MPN-U (MDS/MPN, nicht klassifizierbar) (18).

| Chromosomenanomalien beim MDS | | |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| -7 oder del(7q) | idic(X)(q13) | inv(3)(q21q26.2) |
| -5 oder del(5q) | del(11q) | t(6;9)(p23;q34) |
| -13 oder del(13q) | del(9q) | t(2;11)(p21;q23) |
| i(17q) oder t(17p) | t(11;16)(q23;p13.3) | t(3;21)(q26.2;q22.1) |
| del(12p) oder t(12p) | t(1;3)(p36.3;q21.1) | |

Tabelle 4: Diagnostische Chromosomenanomalien bei MDS laut WHO 2008 (93)

1.4. Das Y-Box-bindende Protein 1 (YBX1)

Das Y-Box-bindende Protein 1 wurde erstmals 1988 durch Didier et al. beschrieben (94). Namensgebend für dieses DNA-bindende Protein war die Interaktion mit der Y-Box (einer invertierten „CCAAT-Box“) der Promotorregion des MHC-II Gens (94, 95). Neben anderen DNA-Sequenzen kann YBX1 auch RNA binden oder mit anderen Proteinen interagieren (95–98). Im Verlauf konnten weitere Mitglieder der Y-Box-bindenden Proteine identifiziert werden und es erfolgte die Einteilung in die drei Subfamilien YB-1, YB-2 und YB-3 (99). Beispielhaft sind in Tabelle 5 Mitglieder der humanen Y-Box-bindenden Proteine aufgeführt. Ihnen gemein ist eine hochkonservierte DNA-Sequenz, die zu ca. 40 % mit dem Cold shock protein A (CspA) von

Escherichia coli übereinstimmt (99, 100). Daher gehören die Y-Box-bindenden Proteine zur Superfamilie der Cold shock Domain (CSD)-Proteine (99). In prokaryotischen Zellen fungieren die Kälteschock-Proteine als RNA-Chaperone und wirken als Stressschutz bei niedrigen Temperaturen (101). In eukaryotischen Zellen besitzt YBX1 vielfältige Funktionen. Parallel zu den prokaryotischen Kälteschockproteinen spielt YBX1 im Rahmen der zellulären Stressantwort eine Rolle. Darüber hinaus ist es an zahlreichen zellulären Regulationsprozessen beteiligt (95).

| | YB-1 | YB-2 | YB-3 |
|----------------------|--|--|---|
| Homo sapiens (human) | YBX1 (Y-box-binding protein 1) NSEBP 1 (Nuclease sensitive element binding protein 1) dpbB (DNA-binding Protein B) | YBX2 (Y-box-binding protein 2) Cotrin dbpC (DNA-binding protein C) | dbpA (DNA-binding Protein A) csdA (Cold shock domain protein A) Single-strand DNA-binding protein NF-GMB |

Tabelle 5: Mitglieder der Y-Box-bindenden Proteine in humanen Zellen (Ausschnitt aus Eliseeva et al., 2011 (99))

1.4.1. Aufbau und Struktur

YBX1 besteht aus 324 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 35,9 kDa (94, 102). Codiert wird YBX1 durch acht Exons auf Chromosom 1p34 und umfasst einen DNA-Bereich von ca. 19 kb (103, 104). Wie alle Mitglieder der drei Y-Box-bindenden Proteinsubfamilien ist YBX1 aus der bereits oben erwähnten CSD und einer C- sowie einer N-terminalen Domäne aufgebaut (105, 106). Die CSD wird im Bereich der Exons 1-5 codiert (103). Ihre Sequenz stimmt in den verschiedenen Y-Box-bindenden Proteinen zu 90 % überein, wohingegen die C- und N-terminalen Domänen deutliche Sequenzunterschiede aufweisen (99).

Die drei Domänen sind wie folgt aufgebaut (s. Abbildung 1):

- 1) Die CSD des YBX1 bildet ein fünfsträngiges, antiparalleles β -Fass (107). Sie ist die evolutionär am höchsten konservierte nukleinsäurebindende Proteindomäne, welche heute in Bakterien und Eukaryoten bekannt ist (104, 108). Der CSD wird eine entscheidende Bedeutung für die DNA- (98, 105) und RNA-Bindung (109) sowie für die intrazelluläre YBX1-Lokalisation und den Transport zugeschrieben (95, 110). Wichtige Bestandteile sind zwei RNA-bindende Sequenzen: RNP-1 und RNP-2 (107, 109). Die Domäne kann außerdem an Serin-102 phosphoryliert werden, was die YBX1-Funktion und -Lokalisation modifiziert (111).

- 2) Das N-terminale Ende (NTD) ist aus einer Alanin- und Prolin-reichen Sequenz aufgebaut (95). Laut Kohno et al. könnte die NTD als sogenannte „trans-activation domain“ fungieren und somit an der Transkriptionsregulation beteiligt sein (95).
- 3) Am C-terminalen Ende (CTD) befinden sich alternierend Folgen von je ca. 30 überwiegend basischen und sauren Aminosäuren, die sogenannten „B/A-Repeats“ (95, 106, 112). Der CTD wird eine entscheidende Rolle im Rahmen der Nukleinsäure-Bindung (113, 114) und Protein-Protein-Interaktion (95) zugeschrieben. Außerdem besitzt die CTD zwei Aminosäuresequenzen, die an der Regulation der intrazellulären YBX1-Lokalisation beteiligt sind (115) sowie mehrere Phosphorylierungsstellen (95).

Da N- und C-terminale Domäne bei Bakterien nicht existent sind, könnten sie im Rahmen der evolutionären Entwicklung von ein- zu mehrzelligen Organismen entstanden sein (116).

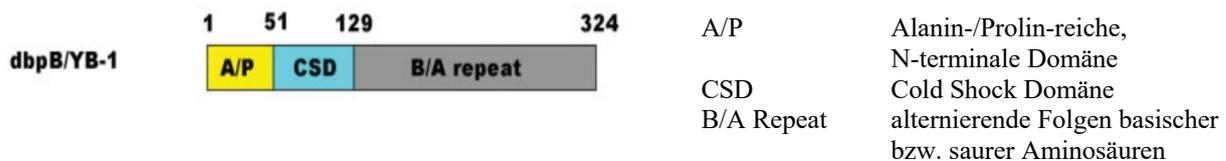


Abbildung 1: Aufbau von YBX1, modifiziert nach Kohno et al. 2003 (95)

1.4.2. Funktion

Aufgrund seiner Struktur nimmt YBX1 Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Hierzu zählen abhängig von der intrazellulären YBX1-Lokalisation Zellzyklusregulation, DNA-Replikation und -Reparatur sowie verschiedene Bereiche der Proteinbiosynthese (99). Es konnten zwei Aminosäuresequenzen im Bereich der CTD nachgewiesen werden, welche für die intrazelluläre Lokalisation entscheidend sind (115): Das NLS (nuclear localization signal) zwischen den Aminosäuren 186-205 und die CRS (cytoplasmic retention site) zwischen den Aminosäuren 247-267 (115). Durch Verlust der NLS-Sequenz ist eine Translokation in den Nukleus unmöglich, wohingegen es durch proteolytische Abspaltung der CRS zur Aufhebung der RNA-Bindung im Zytoplasma und zur nukleären Translokation kommt (115). Auch durch Phosphorylierung wird die YBX1-Translokation zwischen Nukleus und Zytoplasma beeinflusst (111). Eine YBX1-Phosphorylierung geht mit einer erhöhten nukleären YBX1-Konzentration einher (111). Unter normalen Bedingungen überwiegt die zytoplasmatische, insb. perinukleäre

Lokalisation von YBX1 (110). Im Rahmen zellulärer Stresssituationen wie beispielsweise der Zytostatikaexposition (117) oder im Rahmen von oxidativem Stress (118) findet eine nukleäre YBX1-Translokation statt. Durch YBX1-Sekretion wird über extrazelluläre Rezeptoren das umgebende Gewebe beeinflusst, die Zellproliferation der umliegenden Zellen stimuliert und die Zellmigration gefördert (119).

Zellproliferation und Zellzykluskontrolle

YBX1 wird in Geweben mit erhöhter Proliferationsrate wie z.B. in embryonalen Zellen oder in regenerierendem Lebergewebe vermehrt exprimiert (120). Im Rahmen der Embryonalentwicklung von Hühnern nimmt die zelluläre YBX1-Konzentration ab (120). Das Protein nimmt eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation ein. YBX1-defiziente Mäuse weisen hypoplasiebedingte Wachstumsretardierungen verschiedener Organsysteme auf (121). YBX1 nimmt auf die Zellproliferation u.a. über die transkriptionelle Aktivierung verschiedener wachstumsregulierender Gene wie beispielsweise dem EGFR- (122) oder MET-Gen (123) oder durch Translationsstimulation, beispielsweise des c-myc-Protoonkogens (124), Einfluss. Das Protein ist – abhängig von seiner intrazellulären Lokalisation – an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Am Übergang der G1- zur S-Phase wird YBX1 vom Zytoplasma in den Nukleus transportiert und fördert u.a. durch Expressionsanstieg der Cykline A und B1 das Voranschreiten des Zellzyklus sowie die DNA-Replikation (125). Zellzykluskontrollpunkte werden ebenfalls beeinflusst (s. 1.4.3.).

Proteinbiosynthese

Erstmals wurde YBX1 1988 durch Didier et al. als Transkriptionsfaktor mit relativer Spezifität für die Y-Box der Promotorregion des MHC-Klasse II-Gens beschrieben (94). Später konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der YB-1-Familie sowohl an insb. Pyrimidin-reiche DNA-Doppel- und Einzelstränge (96, 98, 120), als auch an RNA (97) binden können. Dadurch ist der Einfluss von YBX1 auf die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum sehr vielseitig (96). YBX1 hemmt oder aktiviert die Transkription von Genen mit sehr unterschiedlichen Funktionen (s. Tabelle 6). Reguliert werden so beispielsweise Gene, die für Proteine der Zellzyklusregulation (z.B. Cyclin A, B1, 125), oder für Zellwachstumsinduktoren (z.B. EGFR, 122) codieren. Auch die Entwicklung von Medikamentenresistenzen wird so beeinflusst (z.B. P-Glykoprotein, 126).

| Gen | Einfluss von YBX1 auf Transkription | Referenz |
|---|-------------------------------------|-----------|
| MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) | Aktivierung | (127) |
| EGFR (epidermal growth factor receptor) | Aktivierung | (122) |
| MET (hepatocyte growth factor receptor) | Aktivierung | (123) |
| MDR1 (Multi Drug Resistance Gen 1) | Aktivierung | (126,128) |
| Cyclin A, B1 | Aktivierung | (125) |
| Fas (CD95/Apo-I) | Hemmung | (129) |
| p53 | Hemmung | (130) |
| VEGF (vascular endothelial growth factor) | Hemmung | (131) |

Tabelle 6: Transkriptioneller YBX1-Einfluss auf die Regulation verschiedener Gene

Im Wesentlichen sind drei Wege der Einflussnahme auf transkriptioneller Ebene beschrieben: die direkte Interaktion mit der DNA-Promotorregion, die Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren im Sinne eines Co-Aktivators/-Repressors und die Interaktion mit der S1-Phase-sensitiven Einzelstrang-DNA (s. Abbildung 2, 95).

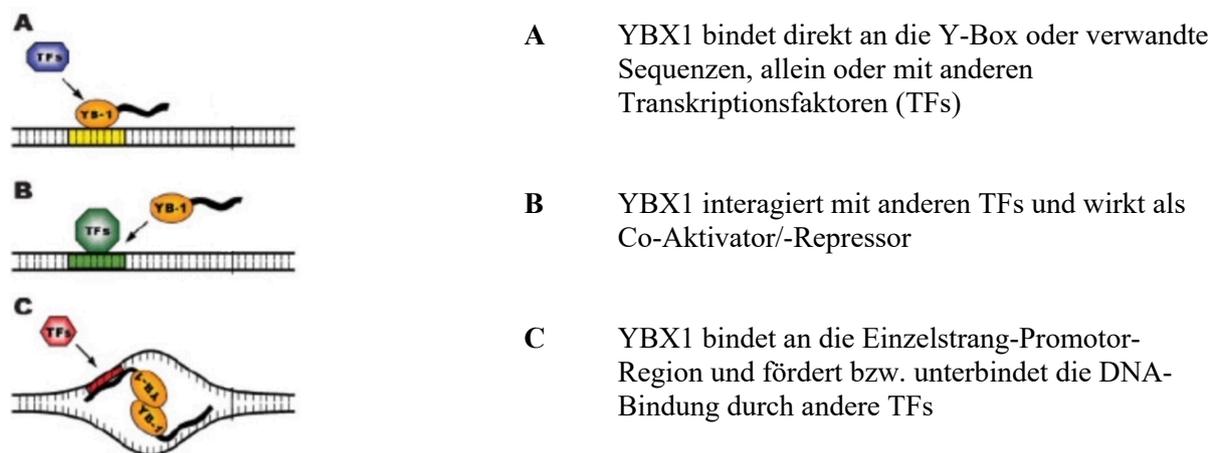


Abbildung 2: Einfluss von YBX1 auf die Transkription, modif. nach Kohno et al. 2003 (95)

YBX1 ist außerdem Teil des Spleißosoms und damit wichtiger Bestandteil des prä-mRNA-Splicings (132). Im Zytoplasma bindet YBX1 die mRNA, stabilisiert diese und nimmt Einfluss auf die Translation (133). Die mRNAs eukaryotischer Zellen bilden Ribonukleoproteinkomplexe, sogenannte mRNPs (messenger ribonucleoprotein). Mitglieder der YB-1-Familie konnten als dominierendes Protein der mRNPs identifiziert werden (133, 134). Bei hohem YBX1-Anteil sind die mRNPs frei im Zytoplasma und somit wenig zugänglich für den Translations-Initiations-Komplex (133). YBX1 wirkt bei hoher Konzentration als Repressor der Translation (133). Ein niedriger YBX1-Anteil ist hingegen für polyribosomale mRNPs typisch und eine Translation kann stattfinden (133). Mitglieder der YB-1-Familie sind auch für die Initiation der Proteinbiosynthese

entscheidend (135). YBX1 beeinflusst darüber hinaus die Halbwertszeit der mRNAs, indem es als Cap-abhängiger mRNA-Stabilisator fungiert und somit den mRNA-Abbau durch Exonukleasen reduziert (136).

DNA-Reparatur

YBX1 besitzt eine erhöhte Affinität zu abasischen (96) oder Cisplatin-modifizierten DNA-Sequenzen (137, 138) sowie zu DNA mit enthaltenen Mismatch-Mutationen (137). Einfluss auf die DNA-Reparaturvorgänge nimmt YBX1 über verschiedene Mechanismen: Unter bestimmten Voraussetzungen konnte z.B. eine Aufspaltung von Doppelstrang-DNA in ihre Einzelstränge (137) sowie eine Endonukleaseaktivität für DNA-Doppelstränge (138) nachgewiesen werden. Außerdem zeigt das Protein eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität für DNA-Einzelstränge (113). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Einflussnahme auf verschiedene an DNA-Reparaturvorgängen beteiligte Proteine (138).

1.4.3. YBX1 und maligne Erkrankungen

Im Gegensatz zu seiner Reparaturfunktion kann YBX1 jedoch auch genetische Instabilität, z.B. durch Zentrosomen-Amplifikation oder Fehler während der Mitose, induzieren und zur Entartung von Zellen beitragen (139). 1997 erschien die erste Publikation, die eine YBX1-Überexpression in den Zellen des primären Mammakarzinoms zeigte (140). Es konnte ein Zusammenhang der YBX1-Expression mit Therapieresistenz und Prognose nachgewiesen werden (140). Seitdem konnte eine erhöhte YBX1-Konzentration in Zellen verschiedener Malignome aufgezeigt werden (141–144). Am Beispiel des Melanoms kann der Einfluss von YBX1 auf die Entstehung und das Fortschreiten von Neoplasien verdeutlicht werden. Im Rahmen der malignen Transformation des Melanoms kommt es zu einer moderaten YBX1-Überexpression (145). Die nukleäre YBX1-Konzentration nimmt von den benignen Nävi über den melanozytären Primärtumor zu den Metastasen zu (145). Je nach Tumorart konnten für YBX1 abhängig von seiner Lokalisation unterschiedliche prognostische Zusammenhänge festgestellt werden. Bei soliden Neoplasien (z.B. Ovarial-Karzinom oder hepatozelluläres Karzinom) steht ein nukleärer YBX1-Nachweis im Zusammenhang mit Therapieresistenz oder schlechter Prognose (140, 141, 143, 144, 146). Zu den Eigenschaften maligner Tumoren zählen neben einem unkontrollierten Zellwachstum das Entgehen der Zellzykluskontrolle oder wachstumshemmender Signale und der Apoptose sowie eine gesteigerte Angiogenese und im Verlauf die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (147). Lasham et al. fassten 2013 zusammen, inwieweit YBX1 auf die einzelnen Tumoreigenschaften

Einfluss nimmt (116). Durch seine zellproliferationsfördernde Wirkung fördert YBX1 das unkontrollierte Tumorzellwachstum (116). Diese wird v.a. durch transkriptionelle und translationelle Aktivierung verschiedener wachstumsaktivierender Gene (s. 1.4.2.) sowie durch Aktivierung proliferationsfördernder Signalwege vermittelt (116). Eine YBX1-Hemmung in Brustkrebszellen führt zu Wachstumsreduktion und Apoptose (148). Eine entscheidende Rolle in der Onkogenese wird z.B. dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg zugeschrieben, dessen konstitutive Aktivierung bei einigen Karzinomen und hämatologischen Erkrankungen wie der AML oder bei BCR/ABL- positivem Mutationsstatus vorliegt (149–151). Auch im Rahmen der JAK2(V617F)-mutierten MPN kommt diesem Signalweg eine entscheidende Bedeutung zu (152, 153). Die Aktivität des PI3K/Akt/mTor-Signalwegs wird durch YBX1 im Rahmen einer autoregulativen Schleife erhöht (145, 154–156). Das für Tumorzellen typische Entgehen der Zellzykluskontrolle wird ebenfalls durch YBX1 begünstigt (116). YBX1 steigert die Expression verschiedener Proteine, die das Voranschreiten des Zellzyklus fördern (vgl. 1.4.2.). Außerdem befähigt YBX1 Zellen dazu, Zellzykluskontrollpunkte zu umgehen. Erwähnt sei beispielsweise das Protein p53, welches bei DNA-Schäden den Zellzyklusarrest zur DNA-Reparatur vermittelt oder aber die Apoptose einleitet (116, 157). YBX1 hemmt den p53-Promotor (130) oder beeinflusst durch direkte Interaktion (158) oder Hemmung der p53-vermittelten Transkription (159) den p53-vermittelten Zellzyklusarrest. YBX1 ist außerdem Repressor des Fas-Rezeptors (CD95/APO-1) und greift somit in den Fas-vermittelten Apoptosesignalweg ein (116, 129). Während der Tumorentstehung durchläuft Gewebe einen angiogenetischen Switch und es kommt zur Bildung neuer Blutgefäße (116). An diesem Prozess sind verschiedene Mediatoren und Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF-A beteiligt (116). Unter normalen Bedingungen fungiert YBX1 als Repressor der VEGF-Expression (131). Diese repressive Wirkung ist jedoch unter hypoxischen Bedingungen aufgehoben und VEGF-A wird vermehrt exprimiert (131, 160). Es wird angenommen, dass YBX1 über diesen Mechanismus Einfluss auf die vaskulären Veränderungen im Rahmen der Onkogenese nimmt (116, 131, 160). YBX1 konnte ein fördernder Einfluss auf das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumoren nachgewiesen werden (116). Das Protein aktiviert z.B. die Transkription des MMP-2 Gens. MMP-2 beeinträchtigt die Integrität der Basallamina von Geweben und fördert somit Invasion und Metastasierung (99, 127). Für das invasive Tumorwachstum und die metastatische Aussaat maligner Tumoren spielt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine entscheidende Rolle (116, 161). Durch Aktivierung der Translation EMT-induzierender Proteine fördert YBX1 diese Prozesse (161). Für YBX1-überexprimierende Tumorzellen konnte die Entstehung disseminierter, kleiner Tumoren

nachgewiesen werden, wohingegen bei Tumorzellen ohne YBX1-Überexpression ein überwiegend lokales Tumorwachstum besteht (161).

1.4.4. YBX1 und Hämatopoese

Die Rolle von YBX1 im Rahmen der Hämatopoese ist bislang nicht gänzlich verstanden. Es häufen sich jedoch Hinweise auf eine entscheidende Rolle von YBX1 im Rahmen der Differenzierung, Überlebensfähigkeit, Proliferation sowie Apoptose von hämatopoetischen Zellen. 2003 wurde erstmals ein YBX1-Einfluss auf die Erythropoese festgestellt (162). In hämatopoetischen Progenitorzellen liegt eine erhöhte nukleäre YBX1-Expression vor, welche im Rahmen der myeloischen Differenzierung abnimmt und in der differenzierten Zelle nur wenig nachweisbar ist (163). Eine abweichende YBX1-Expression scheint zu Anomalien der zellulären Differenzierung zu führen (162–164). In leukämischen Zelllinien liegt in allen Differenzierungsstadien eine erhöhte YBX1-Expression vor (163). Bhullar et al. zeigten, dass durch Senkung des YBX1-Levels in einer humanen CML-Zelllinie ein Wachstumsstopp erreicht und die Apoptose induziert werden kann (163). Diese Daten lassen vermuten, dass YBX1 die leukämische Entwicklung über eine Hemmung der Zelldifferenzierung und Aktivierung der Zellproliferation begünstigt (163). Eine mögliche Wirkungsweise von YBX1 bei Entstehung und Aufrechterhaltung der AML wurde von Liu et al. aufgezeigt (165). Die IKKε-Kinase, welche in myeloischen Leukämiezellen häufig vermehrt exprimiert wird, führt über eine Signalkaskade zur S104-Phosphorylierung von YBX1 (165). Aktiviertes YBX1 steigert die MYC-Expression auf transkriptioneller Ebene durch Bindung an die Promotorregion (165). Die Hemmung dieses Signalwegs führt zu reduzierter Überlebens- und Teilungsfähigkeit der AML-Zellen und resultiert in einer reduzierten Krankheitslast (165). Auch beim MDS konnte im Knochenmark eine erhöhte YBX1-Expression nachgewiesen werden (114, 162).

1.5. Fragestellung der Arbeit

Im Vorfeld der Arbeit wurde anhand einer umschriebenen Fallgruppe in Kooperation mit der Forschungsgruppe um Professor Dr. med. Florian Heidel eine vermehrte YBX1-Expression im Knochenmark von MPN-Patienten beobachtet (166). Ziel dieser Arbeit ist es, die YBX1-Expression bei MPN genauer zu untersuchen. Sieht man eine signifikante YBX1-Expression bei Untersuchung einer größeren Studiengruppe? Im Vorfeld fiel bei einigen MPN-Stanzen ein besonders starker YBX1-Nachweis in den Megakaryozyten auf. In welchen Zelllinien liegt die YBX1-Überexpression vor? Gibt es Expressionsunterschiede zwischen den MPN-Subtypen? Ist die YBX1-Überexpression immunhistochemisch auch bei MDS und AML vorhanden? Um diesen Fragen nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit Beckenkammstanzbiopsien eines Patientenkollektivs der Universitätsklinik Magdeburg mit MPN-, MDS- oder AML-Diagnose semiquantitativ mittels Immunhistochemie auf ihren YBX1-Gehalt hin untersucht. Dabei wurde die YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese gesondert betrachtet. Die restliche Hämatopoese wurde zusammengefasst untersucht. Zur Spezifitätsanalyse wurde die ITP im Sinne einer benignen Vergleichsgruppe in die Studie aufgenommen.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und Studiengruppen

Das Patientenkollektiv stammt aus der Datenbank des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg. Mithilfe eines hausinternen Zugangs zur Befunddatenbank wurden alle Beckenkammstanzbiopsien mit histologischen Veränderungen im Sinne einer MPN (ET, PV, PMF, CML), eines MDS oder einer AML ermittelt, die zwischen Juni 2011 und Januar 2015 beurteilt wurden. Um den Zugriff auf klinische Daten sowie einheitliche Diagnosekriterien zu gewährleisten, wurden ausschließlich Stenzen von Patienten aus der Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie Magdeburg oder aus der hämato-onkologischen Gemeinschaftspraxis Dres. Uhle, Müller, Kröning, Jentsch-Ullrich in Magdeburg ausgewählt. Zusätzlich wurden Stenzen mit unveränderter Knochenmarkhistologie untersucht. Proben von Patienten mit ITP wurden als weitere Kontrollgruppe herangezogen.

Mittels eines Zugangs zum Medos®-System der Universitätsklinik für Hämatologie und Onkologie Magdeburg bzw. über die Datenbank der Gemeinschaftspraxis Dres. Uhle, Müller, Kröning, Jentsch-Ullrich wurden die klinischen Daten der Patienten ermittelt. Besonderer Wert wurde dabei auf die klinische Diagnose und bei den MPN auf den JAK2-Mutationsstatus gelegt. Im Folgenden wurden die klinische und die pathologische Diagnose verglichen. Da eine klinische Diagnose unter Zusammenschau mehrerer Befunde gestellt wird, wurde diese höher gewichtet. Entscheidend für den Einschluss in die Studie und die Eingliederung in die Diagnosegruppen MPN (ET, CML, PV, PMF), MDS und AML war daher die abschließende klinische Diagnose. 19 der eingeschlossenen Knochenmarkschnitte mussten unter Zusammenschau der klinischen Daten anderen Diagnosegruppen zugeordnet werden. 134 der so ermittelten Fälle mussten mangels genügend Material in Form von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Blöcken im Archiv des Instituts für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität aus der Betrachtung herausgenommen werden.

Von diesem Studienkollektiv wurden histologische Schnitte angefertigt und unter Verwendung eines Färbeautomaten mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Es wurden nur Proben in die Studie eingeschlossen, die mindestens 3 beurteilbare Markräume enthielten. Die Beurteilung der Repräsentativität erfolgte unter Aufsicht eines diagnostisch tätigen Pathologen. Von 259 auf diese Weise ermittelten Fällen wurden immunhistologische YBX1-Reaktionen angefertigt und

histologisch ausgewertet. Bei ungleichmäßiger Reaktionsverteilung, welche wahrscheinlich durch insuffizientes Spülen hervorgerufen wurde, oder bei ausgeprägter Hintergrundfärbung wurden die immunhistochemischen YBX1-Reaktionen wiederholt. Bei 15 Fällen zeigte sich eine wiederholt schlechten Qualität. Diese Fälle wurden bei nicht eindeutiger Beurteilbarkeit aus der Betrachtung herausgenommen.

Sämtliche Schnitte und Färbungen wurden im immunhistochemischen Labor des pathologischen Instituts der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

2.2. Reagenzien

iVIEW DAB Detection Kit

iVIEW Inhibitor

iVIEW Biotinylated Ig Secondary
Antibody

iVIEW SA-HRP

iVIEW DAB

iVIEW H₂O₂

iVIEW Copper

Ventana

3 % Wasserstoffperoxidlösung

affinitätsgereinigtes biotinyliertes Ziege-Anti-Maus-IgG und -IgM (< 200 µg/ml), biotinyliertes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (< 200 µg/ml), Phosphatpuffer, Konservierungsmittel ProClin 300

konjugierte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung (< 300 µg/ml), Proteinstabilisator, Konservierungsmittel ProClin 300

Diaminobenzidin (2 g/l), Stabilisatorlösung, Konservierungsmittel.

0,04 %-0,08 % Wasserstoffperoxid,
Phosphatpufferlösung

Kupfersulfat (5 g/l), Acetatpuffer,
Konservierungsmittel

Endogenous Biotin Blocking Kit

Blocker A Lösung

Blocker B Lösung

Ventana

0,1 mg/ml Eiweiß-Avidin, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Konservierungsstoffe

0,1 mg/ml freies Biotin, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Konservierungsstoffe

| | |
|-------------------------------------|---|
| FFPE-Beckenkammstanzbiopsien | Archiv des pathologischen Instituts der OvGU MD |
| Primärantikörper | Anti-YB1 antibody [EP2708Y], abcam |
| Antibody Diluent | VENTANA |
| Pufferlösung | 0,01M Natrium-Citrat-Lösung pH 6,0, Merck |
| Reaktionspuffer | VENTANA |
| Hämalaun nach Mayer | 1g Hämatoxylin in 1000ml Aqua dest.; 0.2g Natriumjodat und 50g reinem Kalialaun |
| Corbit-Balsam | Hecht |
| Xylol | Zentralapotheke Universtitätsklinik Magdeburg |
| Ethanol | Zentralapotheke Universtitätsklinik Magdeburg |
| Coverslip Lösung | VENTANA |
| Aqua dest | Zentralapotheke Universtitätsklinik Magdeburg |

2.3. Geräte

| | |
|---|---|
| Färbeautomat | NexES, VENTANA |
| Dampfkochtopf | Pascal, Dako |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Mikrotom | RM2155, Leica |
| Glasobjektträger | Superfrost Plus, Menzel |
| Deckgläser | Menzel |
| ISP-Zugang | Pathologisches Institut OvGU MD |
| Medos-Zugang | Klinik für Hämatologie und Onkologie OvGU MD |
| Patientendatenbank | Schwerpunktpraxis für Hämatologie und Onkologie Uhle, Müller, Kröning, Jentsch-Ullrich, Magdeburg |
| Datenerfassung/Textverarbeitung: | |
| Microsoft Excel für Mac 2019 | Microsoft Deutschland GmbH |
| Microsoft Word für Mac 2019 | Microsoft Deutschland GmbH |
| Statistik: | IBM SPSS Statistics Version 26 |

2.4. Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie können bestimmte Antigene in Formalin-fixierten, Paraffin-gebetteten (FFPE) Geweben sichtbar gemacht und anschließend mittels Mikroskop qualitativ und semiquantitativ beurteilt werden (167). Es existieren abhängig vom Hersteller unterschiedliche Detektionssysteme, beispielsweise die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-, die Catalyzed Signal Amplification (CSA)- oder die Labelles Streptavidin Biotin (LSAB)-Methode (168). Um YBX1 in den Knochenmarkschnitten darzustellen, wurde das iVIEW DAB Detection Kit von Ventana verwendet (167). Es handelt sich um ein indirektes Biotin-Streptavidin-System, welches in der Lage ist, Kaninchen-Primärantikörper nachzuweisen (167). YBX1 wurde in den präparierten Knochenmarkschnitten mittels eines Anti-YBX1-Antikörpers lokalisiert (167). Gegen diesen Antikörper richtet sich der biotinylierte Sekundärantikörper (167). Ein Meerrettich-Peroxidase-Enzym-Konjugat bindet das Biotin (167). Nach Zugabe einer farblosen Substrat-Chromogen-Lösung entsteht ein farbiges Präzipitat (vgl. Abbildung 3, 167).

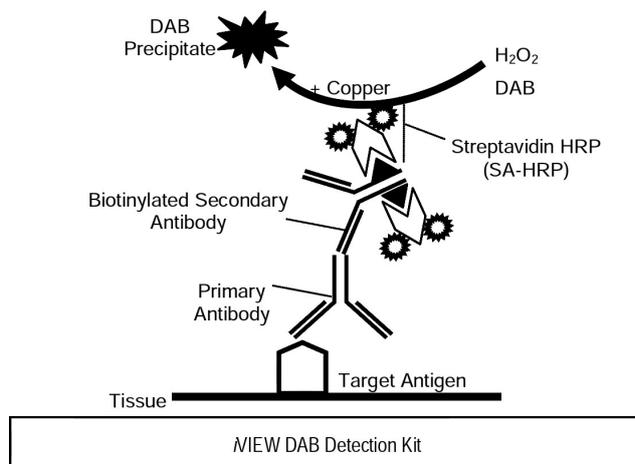


Abbildung 3: Färbeprinzip aus VENTANA iView DAB Detection Kid (167)

2.4.1. YBX1-Antikörper

Beim YBX1-Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen IgG-Antikörper, der aus Kaninchen gewonnen wurde und gegen humanes YBX1 nahe des C-terminalen Endes gerichtet ist (169). Hergestellt durch die Firma abcam gehört er zur Reihe der RabMAb (Rabbit Monoclonal Antibody products) und wird unter dem Namen Anti-YB1 antibody [EP2708Y] geführt (169). Gelöst in 49 % PBS, 0,01 % Natriumazid, 50 % Glycerol und 0,05 % BSA besitzt der Antikörper

eine Stammkonzentration von 0,415 mg/ml (169). Der Antikörper wurde bei einer Temperatur von -20 °C aufbewahrt und vor Gebrauch mit Ventana Antibody Diluent 1:400 verdünnt (169).

2.4.2. Färbeverfahren

Die histologischen Schnittpräparate sowie die immunhistochemischen Reaktionen wurden am Institut für Pathologie durch Mitarbeiterinnen des Routinelabors angefertigt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden zunächst aus den FFPE-Blöcken 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und auf einen Glasobjektträger gezogen. Dieser wurde für mindestens 60 Minuten bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe von Xylol dreimal 5 Minuten lang entparaffiniert. Es folgte die Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe mit zweimal 1 Minute 100 % Ethanol, einmal 1 Minute 96 % Ethanol und einmal 1 Minute 75 % Ethanol. Danach wurden die Proben mit Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. gespült. Während der Fixierung an formalinsensitive Epitope entstehen Crosslinks, die zu einer Epitop-Maskierung führen können. Zur Hitze-induzierten Epitop-Demaskierung folgte eine Inkubation mit 0,01M Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) für 10 Sekunden bei 120 °C in einem Dampfkochtopf (Retrieval Solution). Nach der erneuten Spülung mit Leitungswasser, Aqua dest. und einem Reaktionspuffer wurden die Schnitte mithilfe des NexES Färbeautomaten bearbeitet. Hierbei wurden die Schnitte mit verschiedenen Reagenzien bei 37 °C für definierte Zeiten inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde ein Waschvorgang durchgeführt.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurde der IVIEW-Inhibitor für 4 Minuten inkubiert. Im zweiten Schritt kam es zum 32-minütigen Einsatz des monoklonalen Kaninchen-Anti-YB1-Antikörpers. Um unspezifische Färbungen durch endogenes Biotin zu minimieren, kam das Endogenous Biotin Blocking Kit von Ventana zum Einsatz. Es besteht aus einer Avidin-haltigen Lösung (Blocker A) und aus einer Biotin-haltigen Lösung (Blocker B) (170). Der Blocker A bindet an endogenes Biotin und maskiert dieses. Der Blocker B blockiert die freien Biotin-Bindungsstellen des Avidins (170). Beide Blocker wurden nacheinander mit einer Inkubationszeit von je 4 Minuten eingesetzt. Folgend wurde der I-VIEW biotinierte Ig-Sekundärantikörper für 8 Minuten inkubiert. Nach einem zweifachen Waschvorgang und Coverslip-Auftragung wurde das I-VIEW SA-HRP, ein Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Enzym-Konjugat, für 8 Minuten aufgetragen. Um die so entstandenen Immunkomplexe sichtbar zu machen, wurden die Schnitte in einer Substrat-Chromogen-Lösung mit I-VIEW DAB und H₂O₂ für 8 Minuten inkubiert und eine Kupfersulfat-Lösung (I-VIEW COPPER) für 4 Minuten aufgetragen. Nach 2 weiteren

Waschdurchläufen im Färbeautomaten wurden die Präparate in Leitungswasser und einem Tropfen Spülmittel per Hand gespült und mittels Aqua dest. gereinigt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämalun-Lösung nach Mayer. Mehrminütiges Einstellen in Leitungswasser führte pH-abhängig zum bläulichen Farbumschlag. Anschließend folgte eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe: 1x1min 75 % Ethanol, 1x1min 96 % Ethanol, 2x1min 100 % Ethanol. Abschließend wurden durch zweifache fünfminütige Xylol-Inkubation eventuell entstandene Trübungen entfernt und die Schnitte mit Corbit-Balsam und Deckglas eingedeckt. Bei jedem Färbedurchlauf wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

2.5. Histologische Auswertung

Die Auswertung der immunhistologischen YBX1-Reaktion erfolgte durch die Verfasserin dieser Dissertationsschrift gemeinsam mit einem erfahrenen Pathologen. Um eine Beeinflussung zu vermeiden, wurde sie randomisiert in zufälliger Reihenfolge ohne Kenntnis der vorliegenden Diagnose durchgeführt. Um die Qualität der YBX1-Reaktion zu beurteilen, wurden die Schnitte zunächst mit 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet und hinsichtlich unspezifischer Färbungen und insuffizientem Biotin-Block evaluiert. Bei insuffizientem Biotin-Block oder inhomogener Färbung (a.e. durch insuffizienten Spülvorgang) wurde die immunhistochemische YBX1-Reaktion wiederholt. Bei zweimalig unzureichender Qualität fielen die Schnitte wie oben beschrieben aus der Betrachtung heraus. In den immunhistochemischen YBX1-Reaktionen stellt sich YBX1 braun dar (vgl. Abbildung 4, 167).

Megakaryozyten und die übrigen Zellen der Hämatopoese wurden gesondert betrachtet und jeweils hinsichtlich der Färbeintensität und des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen an der Gesamtreihe beurteilt. Die Färbeintensität wurde dabei in keine (-), leichte (+), mittelstarke (++) und starke Färbung (+++) eingeteilt. Sofern in einem Schnitt mehrere Intensitäten vorhanden waren, wurde die quantitativ überwiegende gewertet. Die Bewertung erfolgte anhand des folgenden Punktesystems:

| | |
|----------------|----------|
| Intensität - | 0 Punkte |
| Intensität + | 1 Punkt |
| Intensität ++ | 2 Punkte |
| Intensität +++ | 3 Punkte |

Die Färbeintensität wird in Abbildung 4 am Beispiel der megakaryozytären Zellreihe demonstriert.

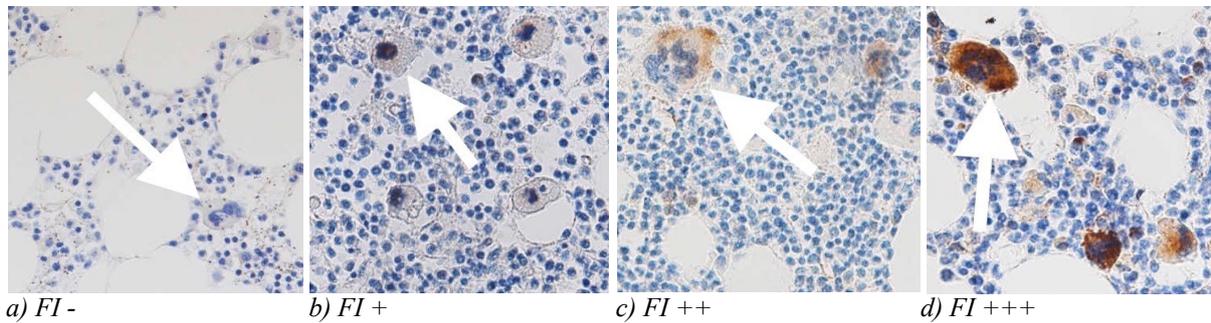


Abbildung 4: Färbeintensität (FI)

Der prozentuale Anteil gefärbter Zellen wurde anschließend geschätzt. Zur vereinfachten Auswertung wurde das Scoring-System des IRS nach Remmele verwendet, welches abhängig vom prozentualen Anteil gefärbter Zellen (GZ) einer Zellreihe Punkte vergibt.

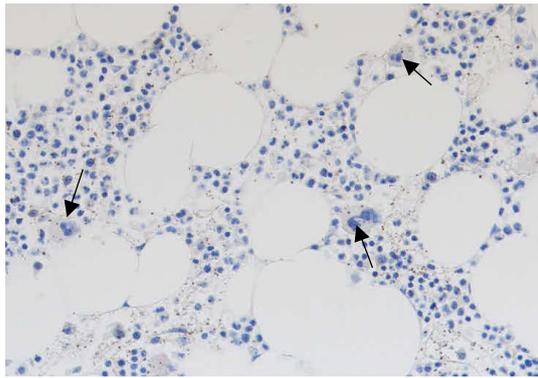
Anteil gefärbter Zellen

| gefärbte Zellen an gesamter Zellreihe | Punkte (GZ) |
|---------------------------------------|-------------|
| 1-9 % | 1 |
| 10-50 % | 2 |
| 51-80 % | 3 |
| 81-100 % | 4 |

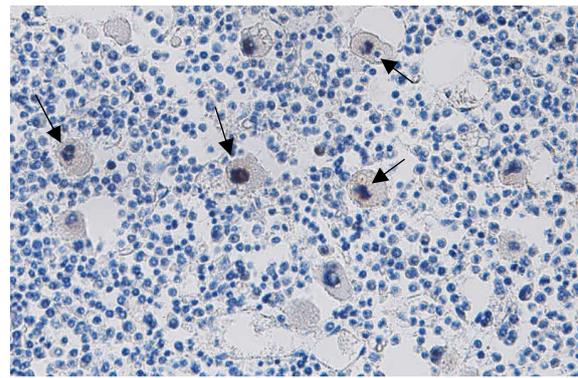
Zur weiteren Auswertung wurde der IRS nach Remmele (171) verwendet und die nach obigem Schema ermittelten Punktwerte für die Färbeintensität (FI) mit dem Anteil der gefärbten Zellen (GZ) multipliziert (Tabelle 7, Abbildung 5). Der so ermittelte IRS wurde für die Auswertung verwendet.

| FI \ GZ | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------|---|---|---|---|----|
| 0 | 0 | | | | |
| 1 | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2 | | 2 | 4 | 6 | 8 |
| 3 | | 3 | 6 | 9 | 12 |

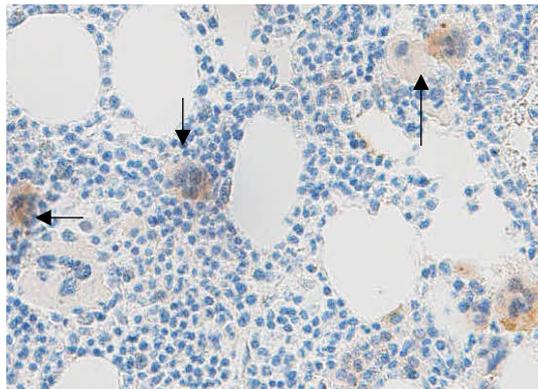
Tabelle 7: IRS (171) aus Färbeintensität (FI) und Punkte nach Anteil gefärbter Zellen (GZ)



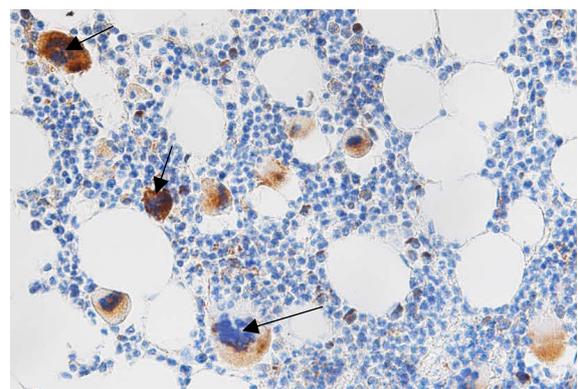
a) IRS: 0 (FI:0, GZ:0)



b) IRS: 4 (FI:1, GZ:4)



c) IRS: 8 (FI:2, GZ:4)



d) IRS: 12 (FI:3, GZ:4)

Abbildung 5: Beispiele für den IRS der megakaryozytären Zellreihe (schwarze Pfeile), abhängig von Färbeintensität (FI) und Punkten nach Anteil gefärbter Zellen (GZ)

2.6. Datenanalyse

Die statistische Auswertung erfolgte gemeinsam mit einer Statistikerin des Instituts für Biometrie und medizinische Informatik des Universitätsklinikums Magdeburg. Es wurde das Statistikprogramm SPSS Statistics verwendet. Aufgrund einer fehlenden Normalverteilung und der unabhängigen Stichproben wurden entsprechende nichtparametrische Tests verwendet. Für das ordinale Skalenniveau des IRS wurde der Zwei-Stichproben-Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Getestet wurde bei dem zweiseitigen Test mit einem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$. Zur Auswertung wurde die asymptotische Signifikanz herangezogen. Bei Vergleich von mehr als 2 Stichproben kam entsprechend der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Hier wurde ein Mehrfach-Paarvergleich mittels Dunns Prozedur angeschlossen. Um das Problem des multiplen Testens zu umgehen, wurde ein Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau α verwendet.

Es wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede der YBX1-Expression in den immunhistochemischen Reaktionen der Knochenmarkschnitte der oben genannten Studiengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe existieren. In einem zweiten Schritt wurden die MPN gegen die ITP im Sinne einer nicht maligne veränderten Vergleichsgruppe auf signifikante Unterschiede der YBX1-Expression untersucht. Die Färbeintensität kann als semiquantitatives Maß für den YBX1-Gehalt in angefärbten Zellen gesehen werden. Je stärker die Intensität, desto höher der YBX1-Gehalt. Der IRS, welcher die Färbeintensität mit dem Anteil der YBX1-exprimierenden Zellen an der megakaryozytären bzw. den übrigen hämatopoetischen Zellreihen kombiniert, spiegelt als indirektes Maß den YBX1-Gehalt der jeweiligen histologischen Knochenmarkschnitte wider.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse des Patientenkollektivs

Basierend auf den anfangs festgelegten Kriterien für den Studieneinschluss (s. 2.1.) ergab sich ein Studienkollektiv von 244 Patienten. Es wurden 89 MPN-, 61 MDS- und 50 AML- Fälle in die Studie eingeschlossen (s. Tabelle 8). Die prozentualen Anteile der Studienuntergruppen am Gesamtkollektiv sind Abbildung 6 zu entnehmen. Die Gruppenmerkmale zu Alter und Geschlecht sind in Tabelle 9 aufgeführt.

| | Fallzahl |
|--------------|----------|
| MDS | 61 |
| MPN: | 89 |
| 1) CML | 19 |
| 2) PMF | 23 |
| 3) ET | 30 |
| 4) PV | 17 |
| AML | 50 |
| Kontrolle | 32 |
| ITP | 12 |
| Gesamtanzahl | 244 |

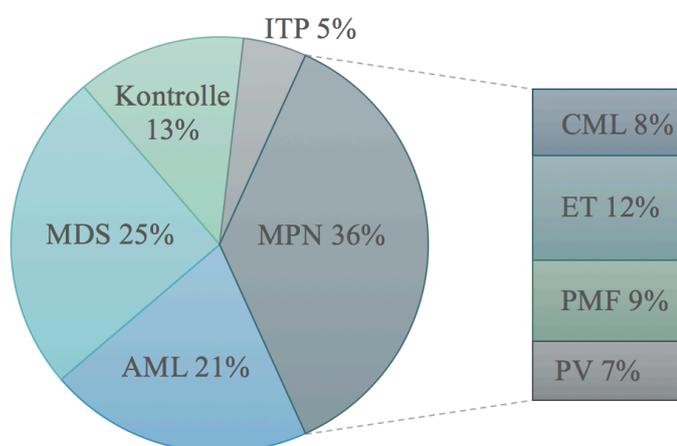


Tabelle 8: Studienkollektiv

Abbildung 6: Prozentuale Anteile der Studiengruppen am Gesamtkollektiv

| | Gesamt | MPN | CML | PMF | ET | PV | MDS | AML | Kontrolle | ITP |
|-------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|--------|
| Anzahl | 244 | 89 | 19 | 23 | 30 | 17 | 61 | 50 | 32 | 12 |
| m | 141 | 54 | 11 | 16 | 14 | 13 | 41 | 24 | 19 | 3 |
| w | 103 | 35 | 8 | 7 | 16 | 4 | 20 | 26 | 13 | 9 |
| m:w | 1,369 | 1,543 | 1,375 | 2,286 | 0,875 | 3,25 | 2,05 | 0,923 | 1,462 | 0,333 |
| Alter, Median | 65 | 61 | 52 | 71 | 61,5 | 62 | 72 | 67,5 | 57 | 61,5 |
| Alter, Mittelwert | 63,111 | 59,652 | 51,947 | 66,83 | 58,1 | 61,29 | 68,16 | 65,52 | 60,094 | 61,083 |
| Min. Alter | 23 | 25 | 32 | 35 | 28 | 25 | 23 | 36 | 33 | 33 |
| Max. Alter | 90 | 84 | 81 | 84 | 80 | 77 | 90 | 83 | 83 | 83 |
| Alter, Spannweite | 67 | 59 | 49 | 49 | 52 | 52 | 67 | 47 | 50 | 50 |

Tabelle 9: Gruppenmerkmale

Für 61 der MPN-Patienten konnte der JAK2-Mutationsstatus ermittelt werden. Bei 37 Patienten lag eine JAK2-Mutation vor. 24 MPN-Patientenproben waren JAK2-negativ.

Als Kontrollgruppe wurden Knochenmarkstanzen von 32 Patienten mit anderen Erkrankungen ohne Beteiligung des Knochenmarks herangezogen. Als zusätzliche Vergleichsgruppe wurden 12 ITP-Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei der ITP kommt es zu einer Zunahme der Megakaryozytenzahl im Knochenmark, jedoch ohne zytologische oder architektonische Knochenmarkveränderungen (172).

YBX1 wurde bei allen Gruppen überwiegend zytoplasmatisch nachgewiesen. Lediglich bei einem AML-, zwei CML-, zwei ET-, einem PMF- und vier MDS-Fällen war neben dem zytoplasmatischen auch signifikant nukleäres YBX1 nachweisbar.

3.2. Statistische Auswertung

Untersucht wurde der immunhistochemisch ermittelte YBX1-Gehalt in den Zellen der Hämatopoese in Knochenmarkstanzbiopsien. Als Maß für die YBX1-Expression der Zellreihen wurde der IRS nach Remmele verwendet (s. 2.5.). Die so ermittelte YBX1-Expression im Knochenmark der MPN-, MDS- und AML-Gruppe wurde mit histologisch unauffälligem Knochenmark (Kontrollgruppe) verglichen. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese gelegt, welche gesondert betrachtet wurde. Die Ergebnisse wurden mittels Boxplot visualisiert. Im Allgemeinen war der IRS der Zellen der übrigen Hämatopoese im Vergleich zu den Megakaryozyten niedriger. Ein Wert von 12 wurde in den Zellen der übrigen Hämatopoese nicht erreicht. Entsprechend wurde die Skalierung der Boxplots angepasst.

3.2.1. Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

3.2.1.1. Zellreihe der Megakaryopoese

Da im Vorfeld der Arbeit bei einer kleinen MPN-Testpopulation eine besonders starke YBX1-Reaktion in den Zellen der Megakaryopoese aufgefallen war, legten wir unser Augenmerk zunächst auf die YBX1-Expression in den gut abgrenzbaren Megakaryozyten.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, fiel eine starke immunhistochemische YBX1-Reaktion in den Megakaryozyten der MPN im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Mit einem mittleren IRS von 3,942 lag eine signifikante YBX1-Überexpression bei den MPN vor (s. Tabelle 10, Abbildung 8).

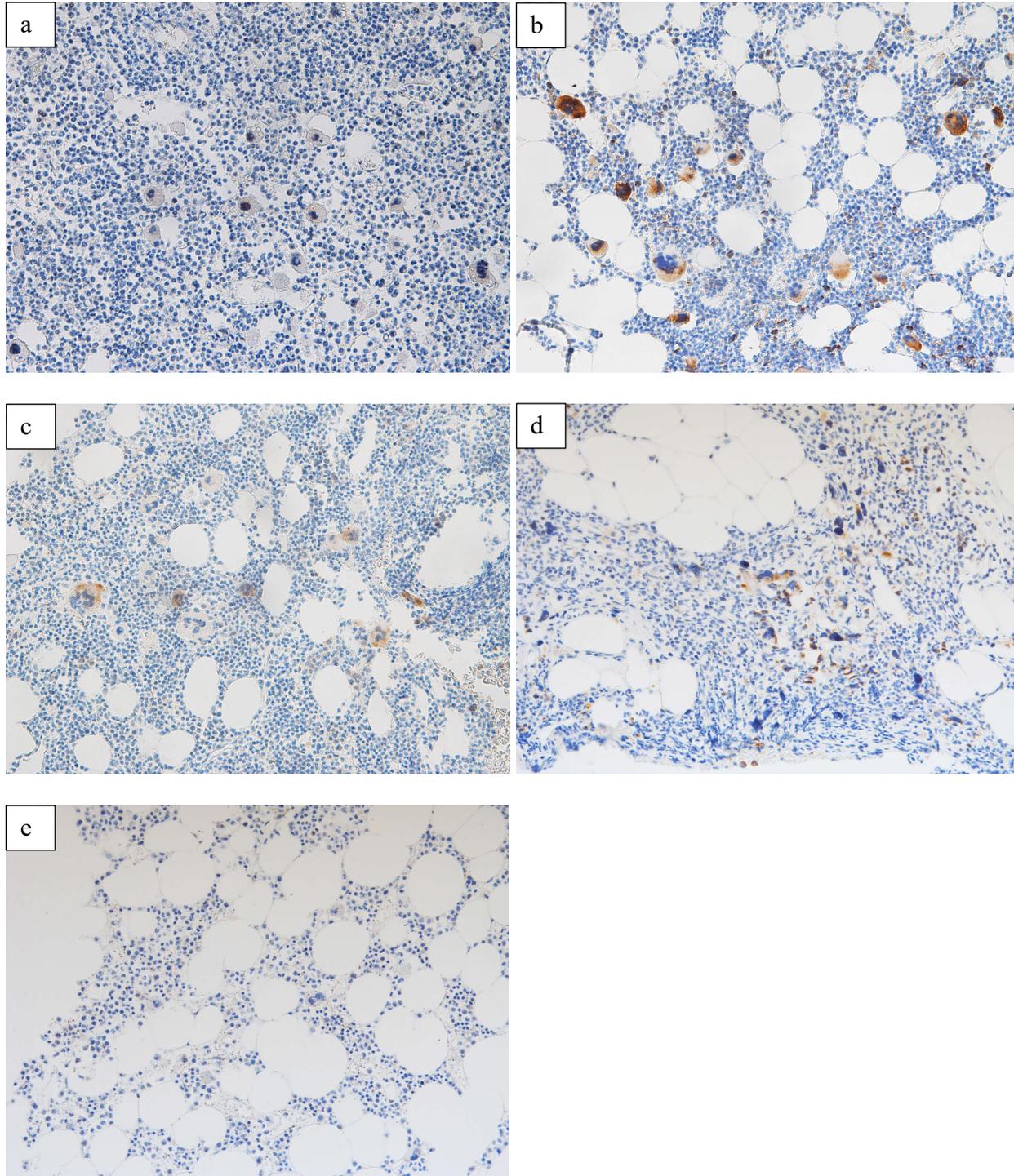
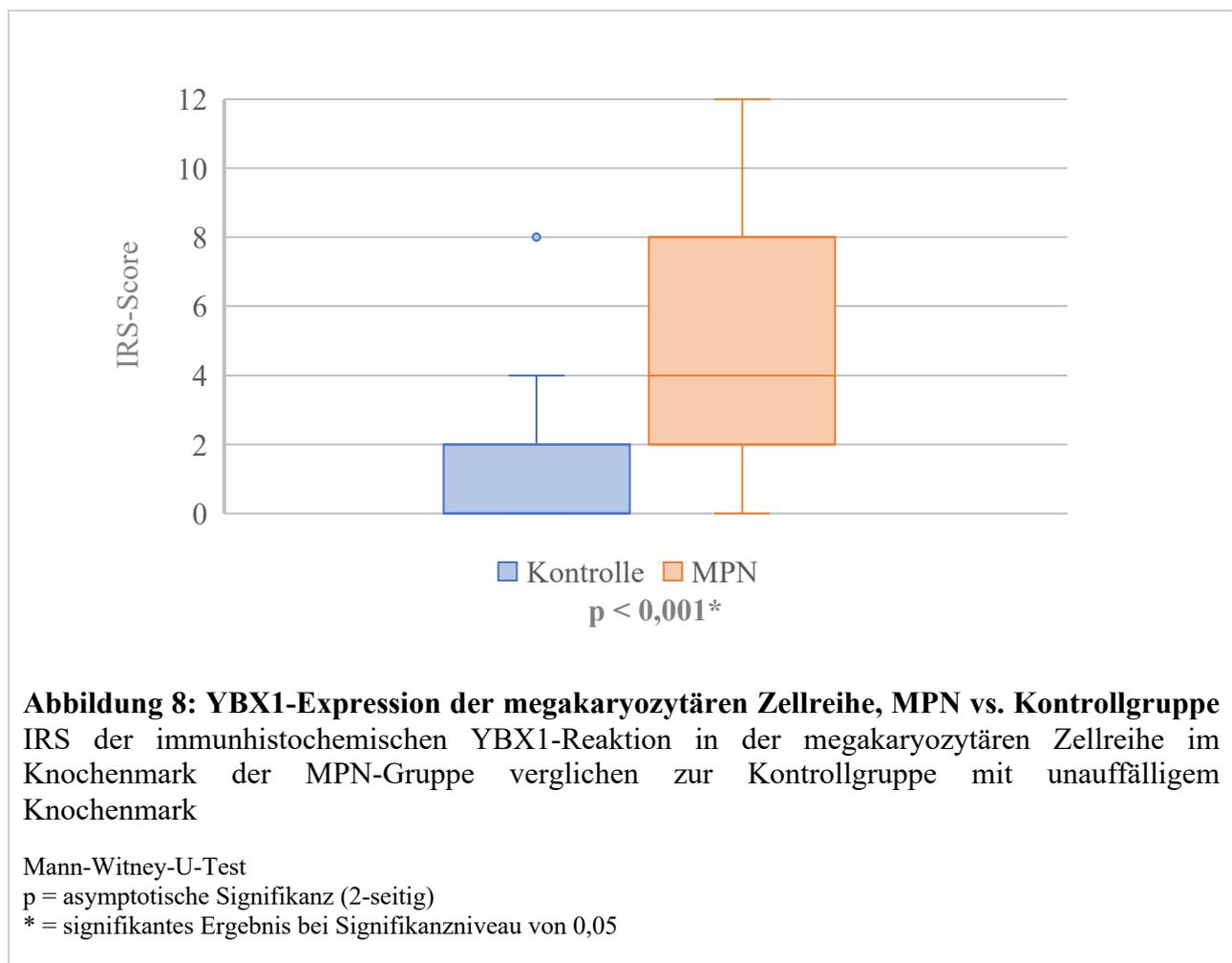


Abbildung 7: Immunhistochemische YBX1-Reaktion im Knochenmark bei a) chronisch myeloische Leukämie (CML), b) essenzielle Thrombozythämie (ET), c) Polycythaemia vera (PV), d) primäre Myelofibrose (PMF), e) Kontrollgruppe

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|--------------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| MPN | 89 | 3,942 | 3,942 | 4,00 | 0 | 12 |
| BCR-ABL-neg. | 70 | 6,06 | 3,893 | 8,00 | 0 | 12 |
| ET | 30 | 6,47 | 3,875 | 7,00 | 0 | 12 |
| PMF | 23 | 5,65 | 4,927 | 8,00 | 0 | 12 |
| PV | 17 | 5,88 | 4,045 | 8,00 | 0 | 12 |
| CML | 19 | 1,95 | 1,957 | 2,00 | 0 | 6 |
| Kontrolle | 32 | 1,031 | 1,858 | 0,00 | 0 | 8 |

Tabelle 10: IRS der megakaryozytären Zellreihe der MPN-Subtypen und der Kontrollgruppe



Innerhalb der MPN-Subtypen bestanden deutliche Unterschiede bezüglich der YBX1-Expression. Abbildung 7 zeigt bei der ET, der PV und der PMF im Gegensatz zur CML eine stärkere megakaryozytäre, immunhistochemische YBX1-Reaktion. Bei Betrachtung des mittleren IRS der MPN-Subtypen bestätigte sich der in Abbildung 7 beschriebene Unterschied der

megakaryozytären YBX1-Expression zwischen der CML mit 1,95 und den BCR-ABL-negativen MPN mit 6,06 (s. Tabelle 10).

Passend zu den oben genannten Ergebnissen war die megakaryozytäre YBX1-Expression der BCR-ABL-negativen MPN (ET, PMF, PV) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei der CML, welche aufgrund ihrer Pathogenese (BCR-ABL-Mutation) unter den hier untersuchten MPN eine Sonderstellung einnimmt, lag im Vergleich zur Kontrollgruppe keine YBX1-Überexpression vor. Die BCR-ABL-negativen MPN exprimierten im Vergleich zur CML signifikant mehr YBX1 in den Megakaryozyten (s. Abbildung 9). Innerhalb der Gruppe der BCR-ABL-negativen MPN (ET, PV, PMF) ergab sich kein signifikanter Expressionsunterschied.

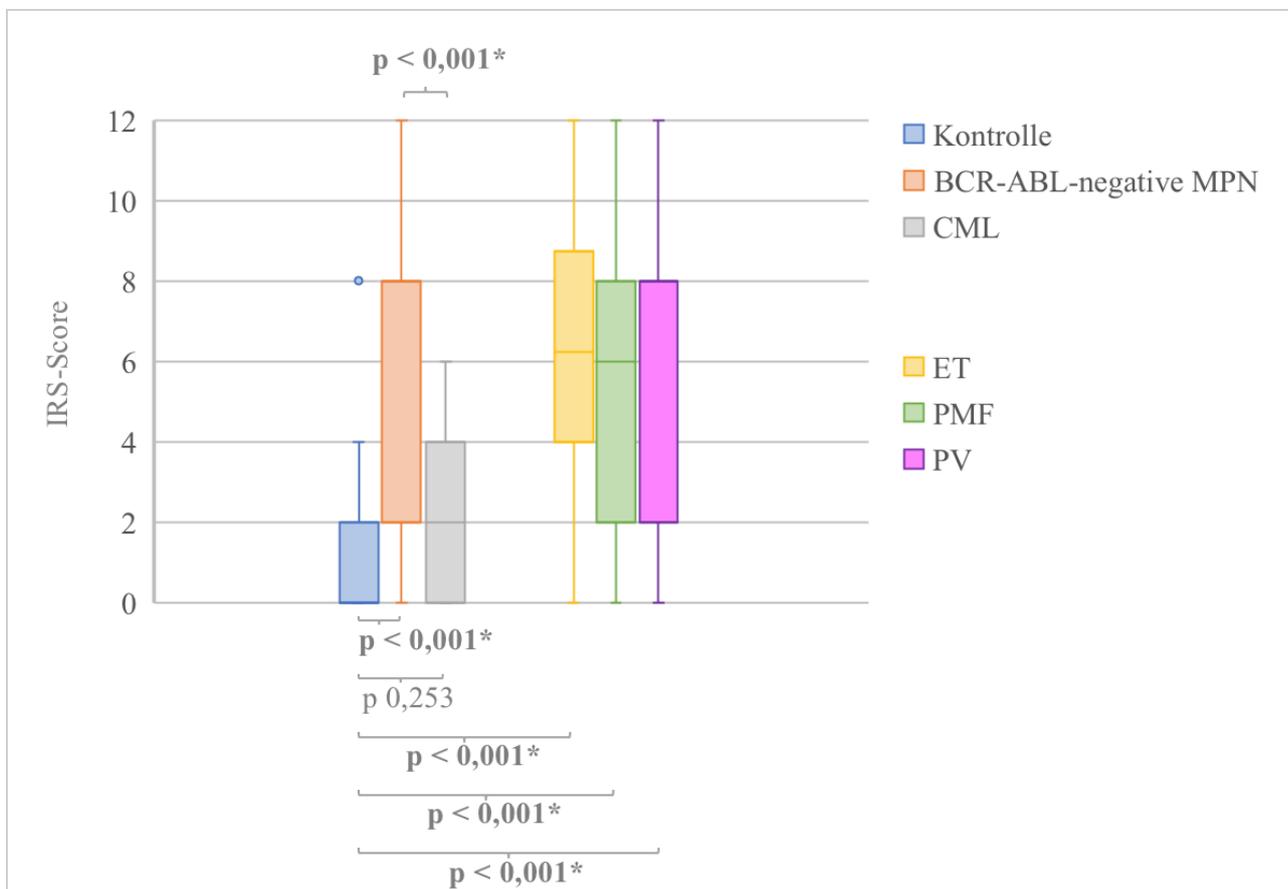


Abbildung 9: YBX1-Expression der megakaryozytären Zellreihe, MPN-Subtypen und Kontrollgruppe

IRS der immunhistochemischen YBX1-Reaktion in der megakaryozytären Zellreihe im Knochenmark der MPN-Subtypen und der Kontrollgruppe

Paarweiser Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test

p = Signifikanzwerte

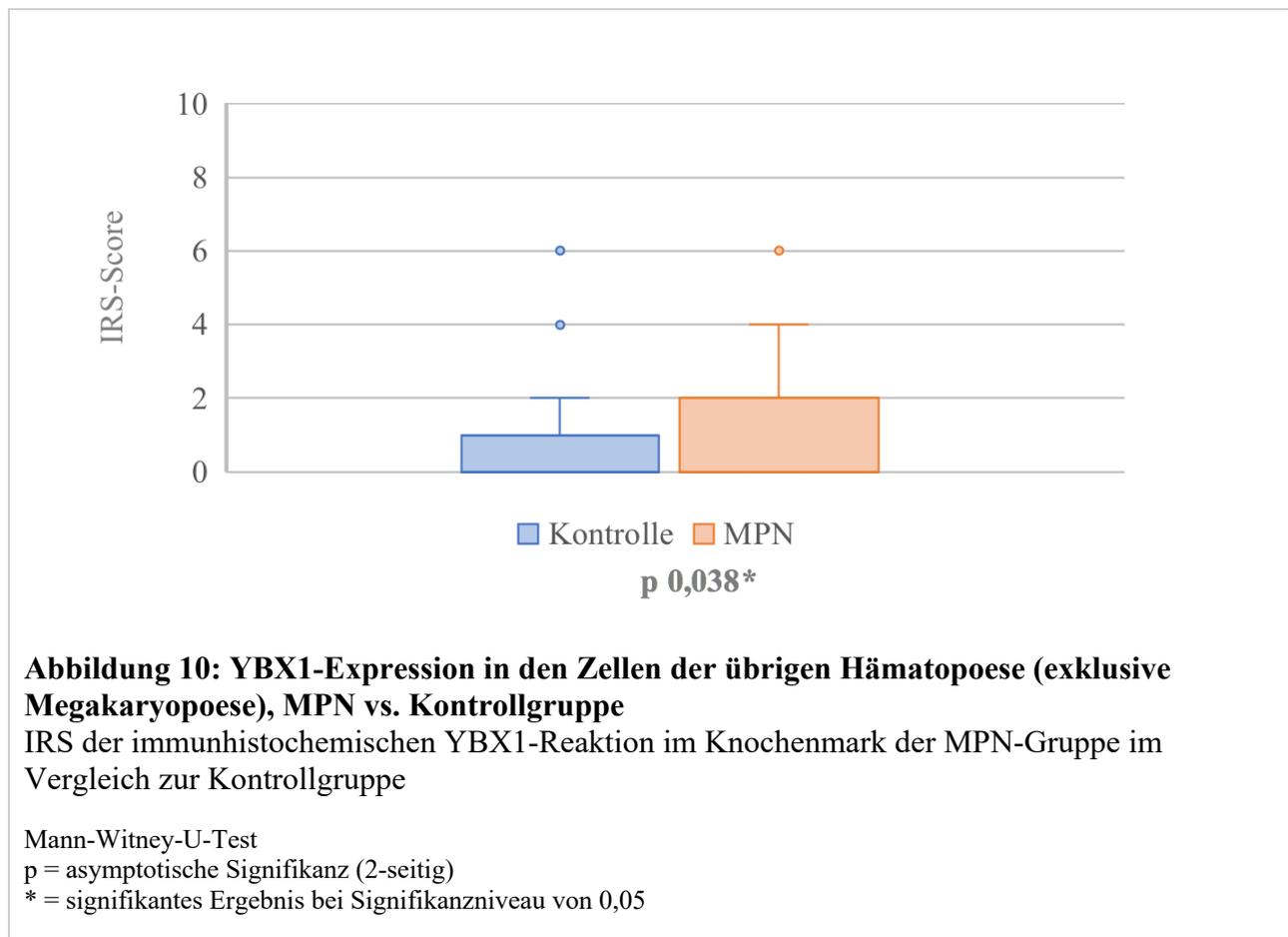
* = signifikantes Ergebnis bei einem Signifikanzniveau 0,05 mit Bonferroni-Korrektur

3.2.1.2. Übrige Hämatopoese

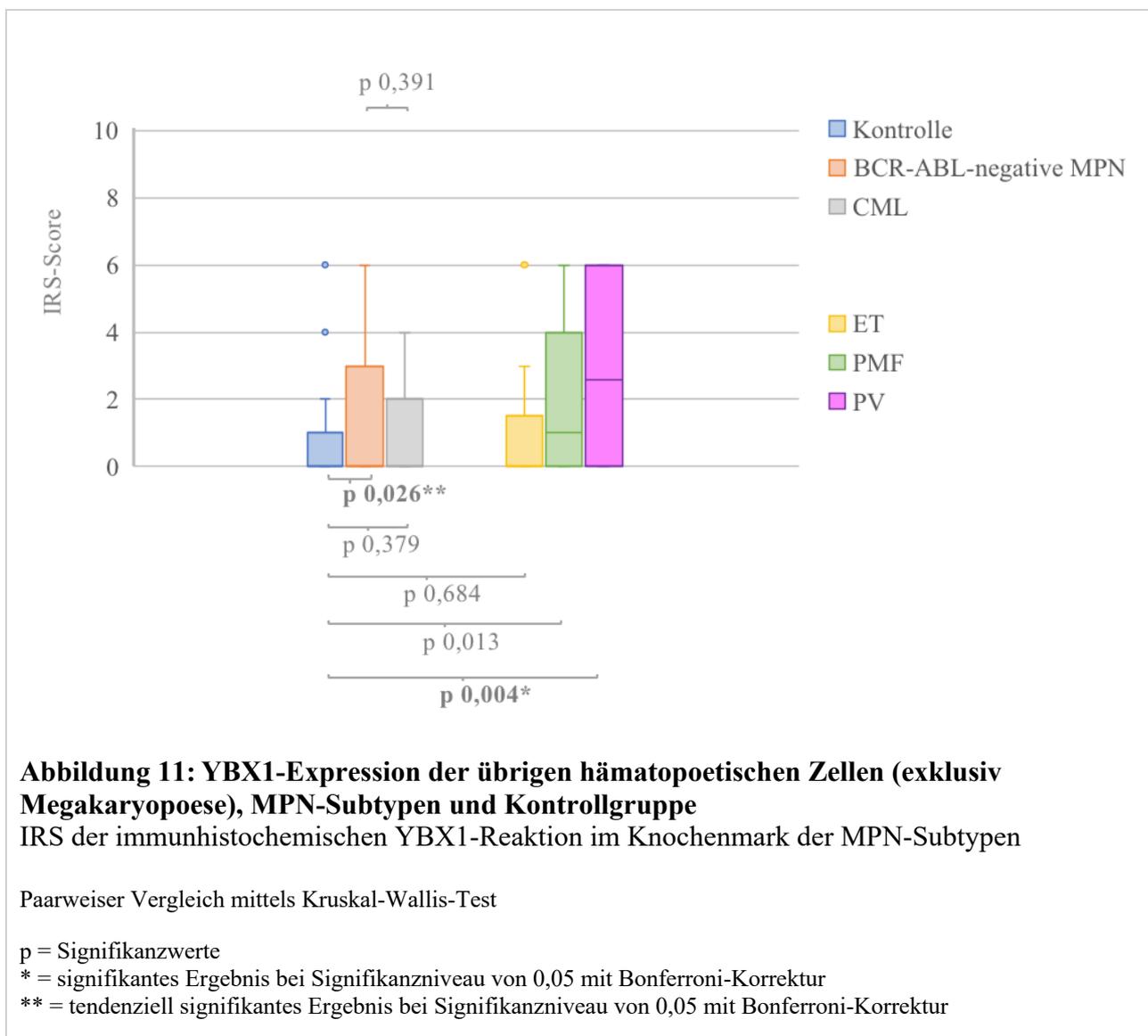
Nach Betrachtung der gut abgrenzbaren Megakaryozyten wurden im Folgenden auch die anderen Zellen der Hämatopoese auf ihre YBX1-Expression hin untersucht. In diesen Zellen lag bei den MPN ebenfalls eine YBX1-Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe vor (s. Tabelle 11, Abbildung 10).

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|--------------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| MPN | 89 | 1,46 | 2,040 | 0,00 | 0 | 6 |
| BCR-ABL-neg. | 70 | 1,63 | 2,195 | 0,00 | 0 | 6 |
| ET | 30 | 0,87 | 1,676 | 0,00 | 0 | 6 |
| PMF | 23 | 1,91 | 2,214 | 1,00 | 0 | 6 |
| PV | 17 | 2,59 | 2,599 | 2,00 | 0 | 6 |
| BCR-ABL-pos. | 19 | 0,84 | 1,167 | 0,00 | 0 | 4 |
| Kontrolle | 32 | 1,32 | 0,594 | 0,00 | 0 | 6 |

Tabelle 11: IRS der übrigen hämatopoetischen Zellen (exklusive Megakaryopoese) bei Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und der Kontrollgruppe



Analog zur megakaryozytären Zellreihe wurden die MPN-Subtypen einzeln untersucht. Bei der PV lag mit einem mittleren IRS von 2,59 die höchste YBX1-Expression unter den MPN-Subtypen vor (s. Tabelle 11). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die YBX1-Expression der PV signifikant gesteigert. Bei der PMF und bei der ET lag hingegen keine signifikante Expressionssteigerung in den übrigen hämatopoetischen Zellen vor. Bei der BCR-ABL-positiven CML war ähnlich wie bei den megakaryozytären Zellen die YBX1-Expression auch in den übrigen hämatopoetischen Zellen nicht signifikant erhöht (s. Abbildung 11). Unter den MPN-Subtypen konnten keine signifikanten Unterschiede im YBX1-Expressionsniveau nachgewiesen werden.



3.2.1.3. JAK2-Mutationsstatus

Wir stellten uns die Frage, ob die YBX1-Überexpression der BCR-ABL-negativen MPN im Zusammenhang mit dem JAK2-Mutationsstatus steht. Für 61 der 70 BCR-ABL-negativen MPN konnten wir den JAK2-Mutationsstatus ermitteln. Bei 37 Fällen lag ein positiver JAK2-Mutationsstatus vor, 24 Fälle waren negativ.

Zunächst wurde die YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese untersucht. Wie oben beschrieben lag in diesen Zellen bei den BCR-ABL-negativen MPN im Vergleich zur Kontrollgruppe eine YBX1-Überexpression vor. Eine Abhängigkeit vom JAK2-Mutationsstatus ließ sich nicht belegen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der YBX1-Expression bei JAK2-positiven bzw. -negativen MPN (s. Tabelle 12, Abbildung 12).

| MPN | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|--------------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| JAK2-positiv | 37 | 5,97 | 4,031 | 6 | 0 | 12 |
| JAK2-negativ | 24 | 5,21 | 3,551 | 6 | 0 | 12 |

Tabelle 12: IRS der megakaryozytären Zellen bei JAK2-positiven bzw. -negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN)

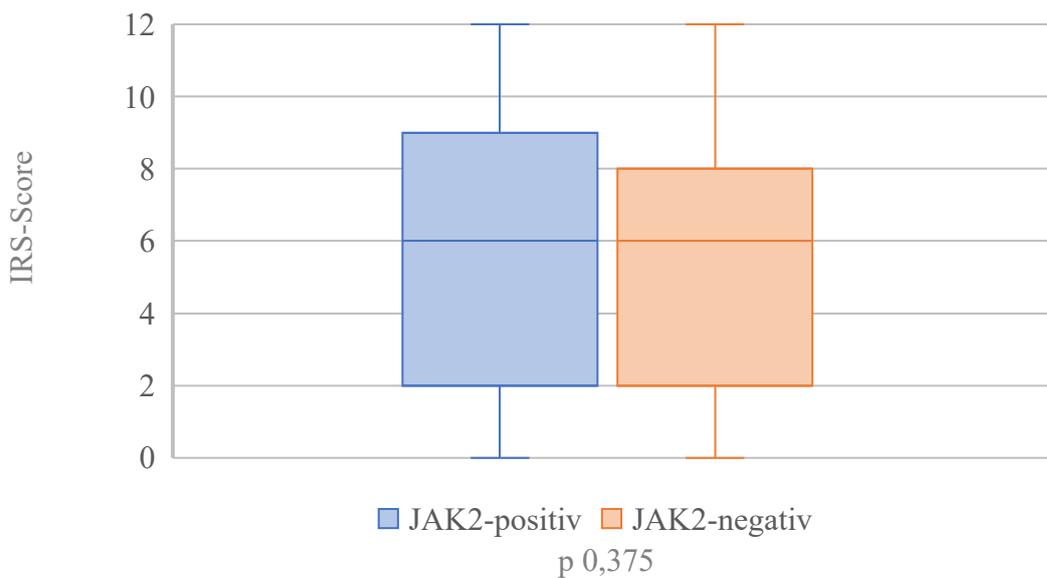


Abbildung 12: YBX1-Expression der megakaryozytären Zellreihe bei JAK2-positiven und JAK2-negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN)

IRS der immunhistochemischen YBX1-Reaktion in der megakaryozytären Zellreihe im Knochenmark JAK2-positiver und JAK2-negativer MPN

Mann-Witney-U-Test

p = asymptotische Signifikanz (2-seitig)

* = signifikantes Ergebnis bei Signifikanzniveau von 0,05

In den Zellen der übrigen Hämatopoese konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im YBX1-Expressionsniveau zwischen JAK2-positiven- und JAK2-negativen MPN nachgewiesen werden (Tabelle 13, Abbildung 13).

| MPN | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|--------------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| JAK2-positiv | 37 | 1,70 | 2,197 | 1 | 0 | 6 |
| JAK2-negativ | 24 | 0,79 | 2,56 | 0 | 0 | 6 |

Tabelle 13: IRS der übrigen hämatopoetischen Zellen (exklusive Megakaryopoese) bei JAK2-positiven bzw. -negativen Myeloproliferativen Neoplasien (MPN)

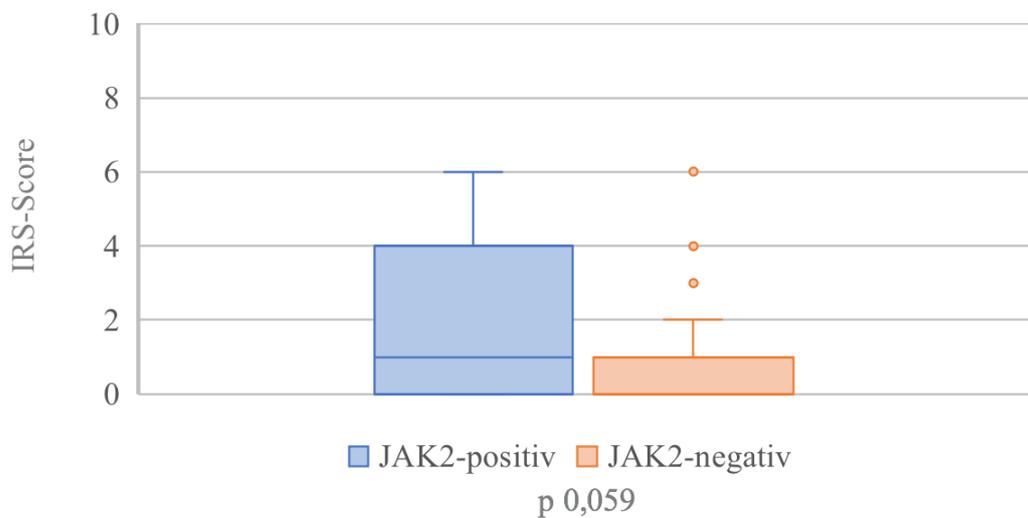


Abbildung 13: YBX1-Expression der übrigen hämatopoetischen Zellen (exklusive Megakaryopoese) bei JAK2-positiven und JAK2-negativen MPN
 IRS der immunhistochemischen YBX1-Reaktion der übrigen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark JAK2-positiver und JAK2-negativer MPN

Mann-Witney-U-Test

p = asymptotische Signifikanz (2-seitig)

* = signifikantes Ergebnis bei Signifikanzniveau von 0,05

3.2.1.4. Immunthrombozytopenie (ITP)

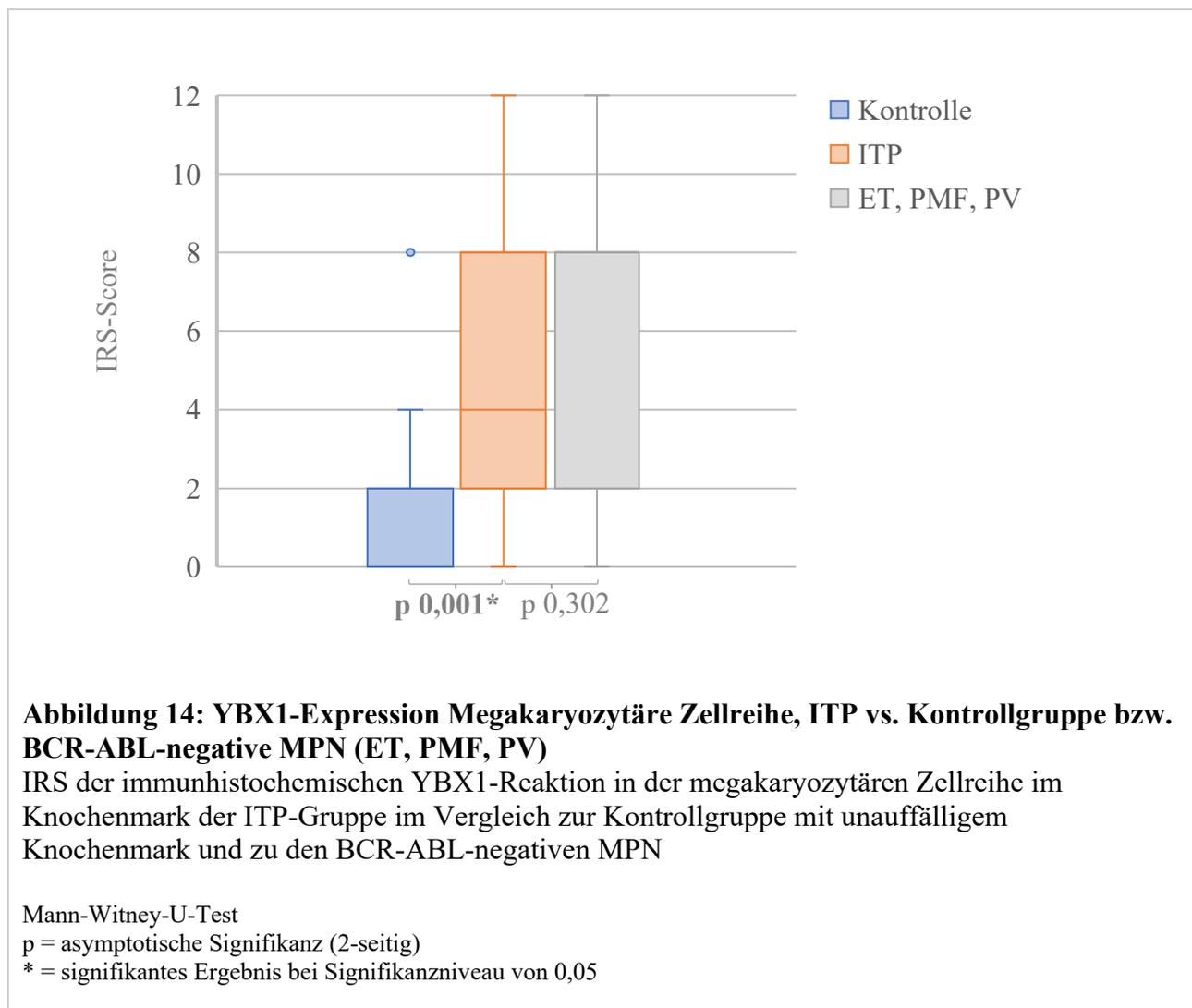
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die vermehrte YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese der BCR-ABL-negativen MPN (PV, ET, PMF) ein spezifisches Merkmal myeloproliferativer Neoplasien ist und somit im Rahmen der pathologischen Diagnostik bei der Abgrenzung zu reaktiven Veränderungen helfen kann. Es wurde daher die ITP als weitere Vergleichsgruppe herangezogen, bei der ebenfalls die Megakaryopoese im Knochenmark gesteigert ist.

Der IRS der ITP-Fälle lag mit einem Wert von 4,83 etwas unter dem der BCR-ABL-negativen MPN mit 6,06 (s. Tabelle 14). In den megakaryozytären Zellen der ITP-Fälle war die YBX1-Expression ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe (s. Abbildung 14).

Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte der IRS der megakaryozytären Zellreihe der ITP aufgrund der hohen YBX1-Expression nicht signifikant gegen die BCR-ABL-negativen MPN abgegrenzt werden. Bei beiden Gruppen lag eine deutliche YBX1-Überexpression vor.

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|-------------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| ET, PMF, PV | 70 | 6,06 | 3,893 | 8,00 | 0 | 12 |
| ITP | 12 | 4,83 | 3,857 | 4,00 | 0 | 12 |
| Normal | 32 | 1,03 | 1,858 | 0,00 | 0 | 8 |

Tabelle 14: IRS der megakaryozytären Zellen bei BCR-ABL-negativen MPN (ET, PMF, PV), ITP und Kontrollgruppe



3.2.2. Myelodysplastische Syndrome (MDS)

3.2.2.1. Zellreihe der Megakaryopoese

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die YBX1-Expression in 61 Knochenmarkstanzbiopsien von Patienten mit MDS untersucht. Diese wurden mit der Kontrollgruppe verglichen, die bereits oben beschrieben wurde. Wie in Abbildung 15 dargestellt, fiel eine starke immunhistochemische YBX1-Reaktion in den Zellen der Megakaryopoese bei MDS im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Mit einem mittleren IRS von 2,754 exprimierten die Megakaryozyten in den MDS-Proben signifikant mehr YBX1 als in den Kontrollproben mit einem mittleren IRS von 1,031 (s. Tabelle 15, Abbildung 16). Somit zeigt sich, wie schon bei den BCR-ABL-negativen MPN, auch beim MDS eine megakaryozytäre YBX1-Überexpression.

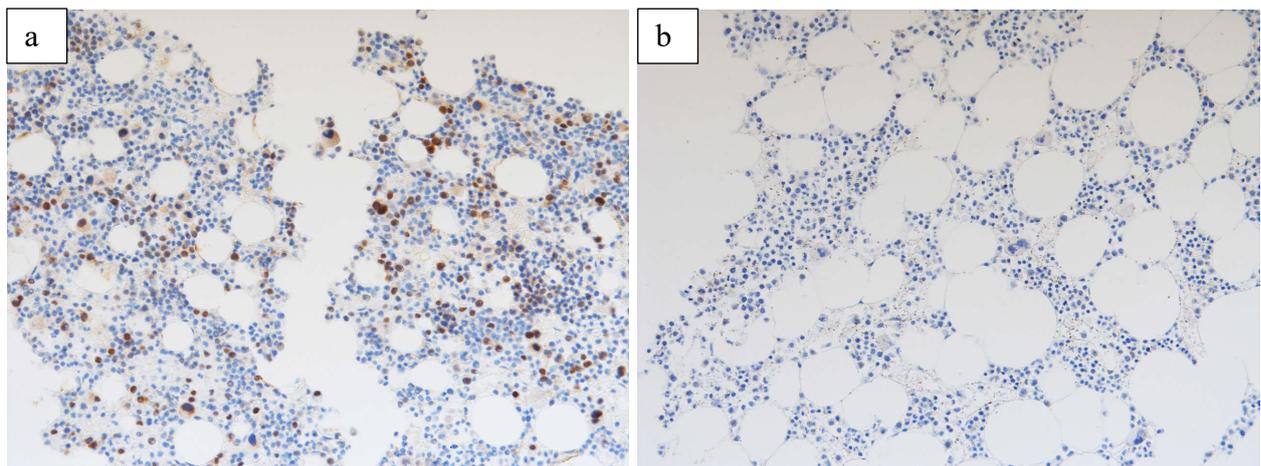


Abbildung 15: Immunhistochemische YBX1-Reaktion (200-fache Vergrößerung) im Knochenmark von a) MDS, b) Kontrolle

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| MDS | 61 | 2,754 | 3,233 | 2,00 | 0 | 12 |
| Kontrolle | 32 | 1,031 | 1,858 | 0,00 | 0 | 8 |

Tabelle 15: IRS der megakaryozytären Zellreihe MDS und Kontrollgruppe

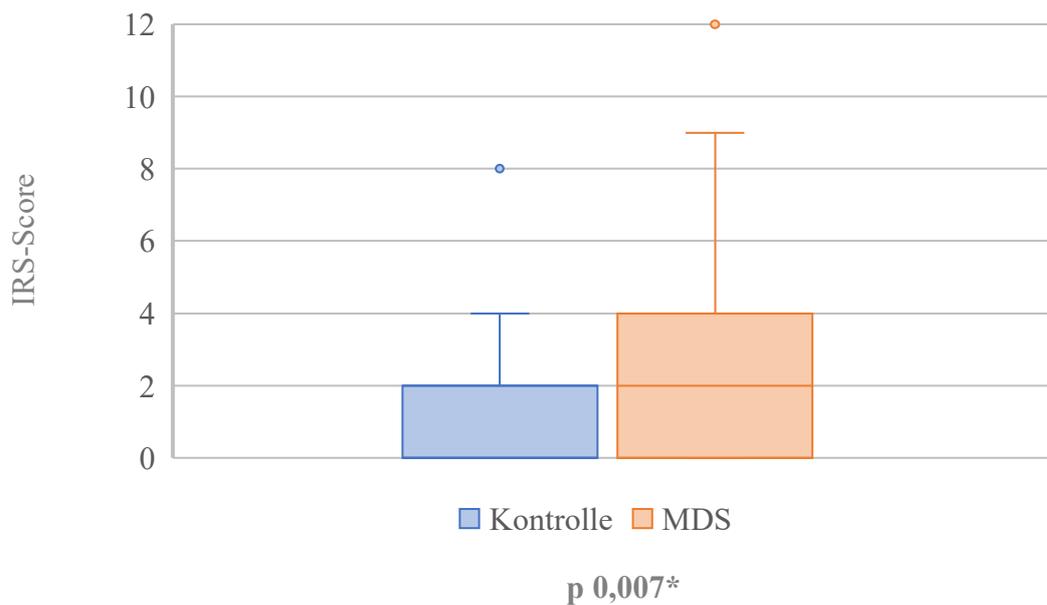


Abbildung 16: YBX1-Expression Megakaryozytäre Zellreihe, MDS vs. Kontrollgruppe
 IRS der immunhistochemischen YBX1-Reaktion in der megakaryozytären Zellreihe im Knochenmark der MDS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unauffälligem Knochenmark

Mann-Witney-U-Test

p = asymptotische Signifikanz (2-seitig)

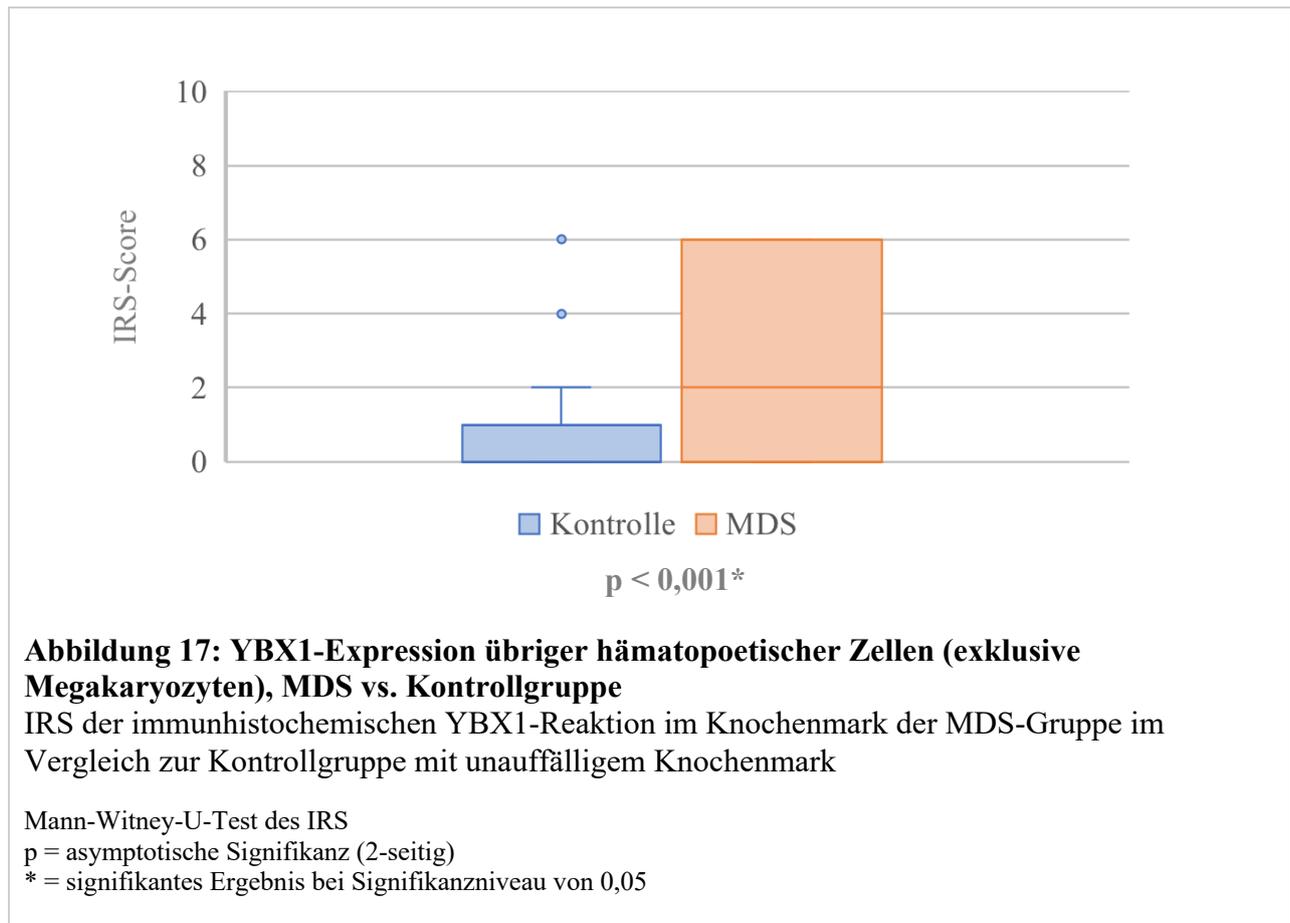
* = signifikantes Ergebnis bei Signifikanzniveau von 0,05

3.2.2.2. Übrige Hämatopoese

In Abbildung 15 ist neben dem beschriebenen megakaryozytären YBX1-Nachweis eine starke YBX1-Überexpression in den anderen hämatopoetischen Zellen zu erkennen. Der IRS der übrigen hämatopoetischen Zellen fiel für die MDS-Gewebeproben mit einem Mittel von 2,984 signifikant höher aus als der der Kontrollgruppe mit einem mittleren IRS von 0,59 (s. Tabelle 16, Abbildung 17). Es ist auf eine signifikant höhere YBX1-Expression in den übrigen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark von MDS-Patienten im Vergleich zu nicht-erkrankten Kontrollpatienten zu schließen.

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| MDS | 61 | 2,984 | 2,460 | 2,00 | 0 | 6 |
| Kontrolle | 32 | 0,59 | 1,316 | 0,00 | 0 | 6 |

Tabelle 16: IRS der übrigen hämatopoetische Zellen (exklusive Megakaryozyten) bei MDS und Kontrollgruppe



3.2.3. Akute myeloische Leukämie (AML)

20-30 % der MDS-Fälle gehen in eine AML über (85, 87, 88). Auch eine post-MPN-AML ist möglich (69). Die Zahlen zur Inzidenz sind in der Literatur stark schwankend. Aufgrund der erhöhten YBX1-Expression bei MPN und MDS stellten wir uns die Frage, ob die erhöhte Expression auch im Rahmen der AML immunhistochemisch nachweisbar ist. In Abbildung 18 ist bei der AML eine sehr starke immunhistochemische YBX1-Reaktion zu erkennen. Ausgehend von der Annahme, dass ein Großteil der nicht-megakaryozytären Zellen bei der AML Blasten sind, wurden zunächst diese Zellen untersucht. Mit einem mittleren IRS von 3,28 exprimierten die Zellen der AML signifikant mehr YBX1 als die hämatopoetischen Zellen der Kontrollgruppe (s. Tabelle 17, Abbildung 19).

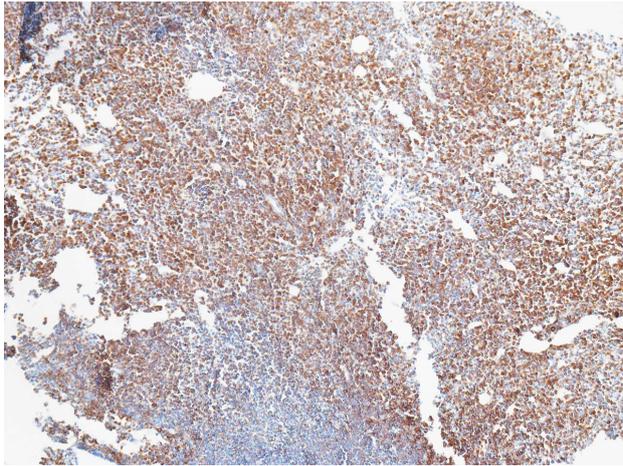


Abbildung 18: Immunhistochemische YBX1-Reaktion AML, 100-fache Vergrößerung

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| AML | 50 | 3,28 | 2,899 | 2,50 | 0 | 9 |
| Kontrolle | 32 | 0,59 | 1,316 | 0,00 | 0 | 6 |

Tabelle 17: IRS übrige hämatopoetische Zellen (exklusive Megakaryopoese) bei AML und Kontrollgruppe

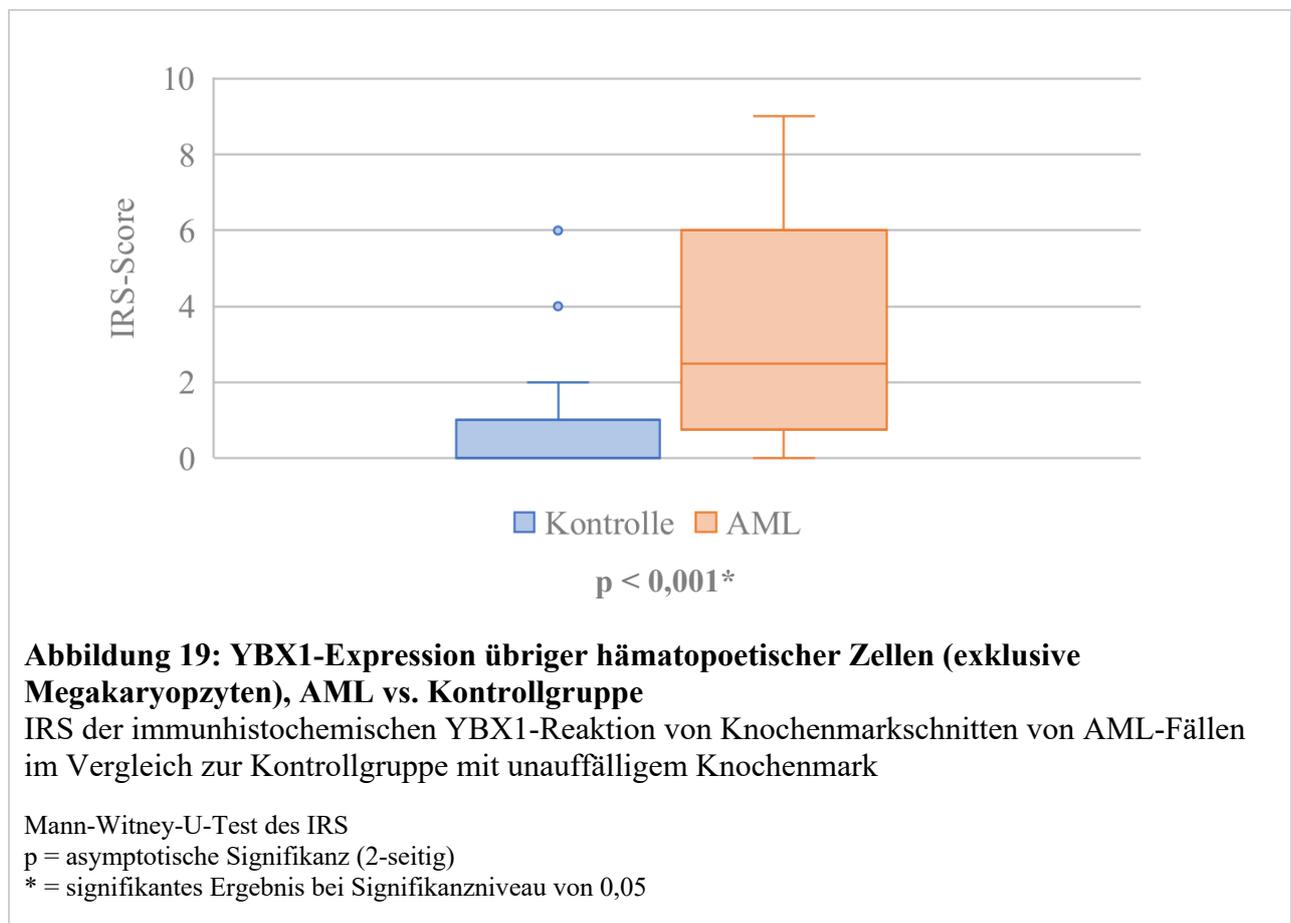


Abbildung 19: YBX1-Expression übriger hämatopoetischer Zellen (exklusive Megakaryopzyten), AML vs. Kontrollgruppe

IRS der immunhistochemischen YBX1-Reaktion von Knochenmarkschnitten von AML-Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unauffälligem Knochenmark

Mann-Witney-U-Test des IRS

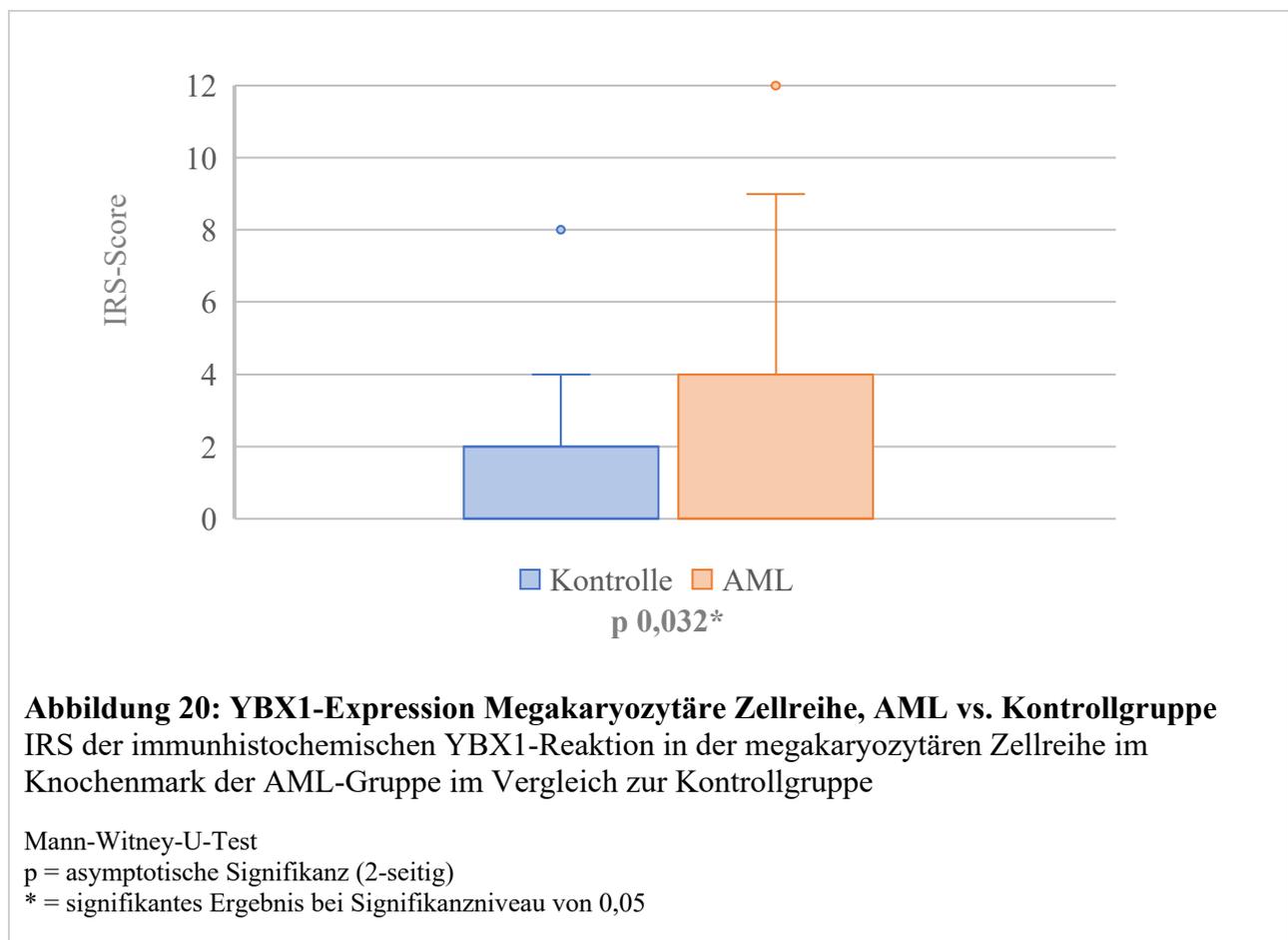
p = asymptotische Signifikanz (2-seitig)

* = signifikantes Ergebnis bei Signifikanzniveau von 0,05

Interessanterweise war bei der AML auch eine YBX1-Überexpression in den Megakaryozyten zu erkennen. Diese war gegenüber der Kontrollgruppe mit einem mittleren IRS von 2,74 ebenfalls signifikant gesteigert (s. Tabelle 18, Abbildung 20).

| | Anzahl | Mittelwert | SD | Median | Minimum | Maximum |
|-----------|--------|------------|-------|--------|---------|---------|
| AML | 50 | 2,74 | 3,475 | 0,00 | 0 | 12 |
| Kontrolle | 32 | 1,031 | 1,858 | 0,00 | 0 | 8 |

Tabelle 18: IRS megakaryozytärer Zellen bei AML und Kontrollgruppe



4. Diskussion

YBX1 nimmt Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, die Zellproliferation und die Proteinbiosynthese. Es wird in Geweben mit erhöhter Proliferationsrate vermehrt exprimiert (120). YBX1 kann zur Induktion genetischer Instabilität und Entartung von Zellen beitragen (138). Zusätzlich ist eine vermehrte YBX1-Expression bei Malignomen unterschiedlichster Art, auch bei hämatologischen Malignomen, nachweisbar und teilweise von prognostischer Bedeutung (141, 143, 146, 173, 174). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die YBX1-Expression bei hämatopoetischen Precursorzellen erhöht ist und im Rahmen der myeloischen Differenzierung abnimmt (163). Dies deutet auf eine herausragende Rolle von YBX1 im Rahmen der Hämatopoese hin. In dieser Arbeit sollte deshalb YBX1 im Zusammenhang mit Erkrankungen der Hämatopoese genauer untersucht werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine umschriebene Pilotstudie von Professor Dr. med. F. Heidel in Kooperation mit PD Dr. med. N. Schröder, dem Betreuer dieser Dissertation, durchgeführt. Bei einem Studienkollektiv von insgesamt 5 Patienten mit JAK2-positiver MPN wurde eine erhöhte YBX1-Expression im Knochenmark im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (n=4) nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen einer Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Society of Hematology 2014 vorgestellt (166).

In dieser Arbeit sollte zunächst die YBX1-Expression bei MPN an einer größeren Studienpopulation untersucht werden. Ein wichtiger Punkt war auch, ob der Nachweis einer Expression von YBX1 in Gewebeproben im Rahmen der pathologischen Diagnostik von Nutzen sein kann. Wir untersuchten den immunhistochemisch ermittelten YBX1-Gehalt im Knochenmark von 89 Patienten mit diagnostizierter MPN im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von 32 Patienten ohne Auffälligkeiten im Knochenmark. BCR-ABL-negative MPN wiesen dabei eine signifikante YBX1-Überexpression auf. Interessanterweise konnten wir sowohl bei der ET als auch bei der PMF und der PV diese Überexpression insbesondere in den Zellen der Megakaryopoese nachweisen. Über eine vermehrte YBX1-Expression in den Zellen der Megakaryopoese im Knochenmark BCR-ABL-negativer MPN war, mit Ausnahme der oben genannten Pilotstudie, bis zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Im Rahmen der ET, der PMF und der PV kommt es u.a. zu einer Steigerung der Megakaryopoese (18, 33). Die vermehrte YBX1-Expression deckt sich somit mit der in der Literatur beschriebenen Expressionserhöhung von YBX1 in Geweben mit erhöhter Proliferationsrate (120). Bei Betrachtung der übrigen hämatopoetischen Zellen der BCR-ABL-negativen MPN liegt lediglich im Rahmen der PV eine signifikante YBX1-Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Dieses erhöhte YBX1-Expressionsniveau bei PV lässt sich

durch die meist vorliegende trilineäre Hyperzellularität im Knochenmark erklären (18). Im Rahmen der PMF und der ET zeigte sich keine signifikante YBX1-Überexpression in den übrigen hämatopoetischen Zellen. Bei der ET steht hauptsächlich die megakaryozytäre Proliferation im Vordergrund. Meist kommt es zu keinem signifikanten Anstieg der Granulo- und Erythropoese (18). Daher ist ein fehlender YBX1-Nachweis in Zellen außerhalb der Megakaryopoese nicht verwunderlich. Bei der präfibrotischen PMF liegt i.d.R. neben den megakaryozytären Clustern eine gesteigerte Granulopoese im Knochenmark vor (18), welche mit einer YBX1-Überexpression in dieser Zellreihe einhergehen könnte. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden die PMF-Fälle nicht abhängig von Erkrankungsstadium und Fibrosegrad untersucht. Es wären Untersuchungen anzuschließen, inwieweit im präfibrotischen Stadium ggf. eine YBX1-Expressionssteigerung insbesondere innerhalb der granulozytären Vorstufen vorliegt.

Die hier nachgewiesene YBX1-Expression im Rahmen von BCR-ABL-negativen MPN bestätigt die Ergebnisse unserer Kooperationsgruppe um Professor Dr. med. F. Heidel. Im Jahre 2020 wurden erste Ergebnisse diesbezüglich publiziert. Es wurde eine erhöhte YBX1-Expression in Beckenkammstanzbiopsien JAK2-positiver MPN, verglichen mit einer normalen Vergleichsgruppe, nachgewiesen (175). Teile unserer Studienpopulation und Ergebnisse sind in dieser Veröffentlichung enthalten (175). Außerdem konnten Jayavelu et al. auch eine YBX1-vermittelte Persistenz JAK2-mutierter Zellklone unter JAK-Inhibitor-Therapie nachweisen (175). Eine YBX1-Eliminierung führt zu erhöhtem Therapieansprechen mit Induktion der Apoptose in JAK2-mutierten Zellklonen und zur molekularen Remission (175). Eine genetische YBX1-Inaktivierung hat keinen Effekt auf die normale Hämatopoese (175). Bei JAK2-positiven MPN fungiert YBX1 als Mediator der Krankheitspersistenz (175). Im Rahmen dieser Publikation wurden ausschließlich JAK2-positive MPN betrachtet. Eine JAK2-Mutation kann bei ca. 96 % der PV-, 65 % der PMF- und bei 55 % der ET-Fälle nachgewiesen werden (47, 48). In unserem Studienkollektiv sind ebenfalls 37 JAK2-positive MPN enthalten. Wir konnten weder einen YBX1-Expressionsunterschied in den Zellen der Megakaryopoese noch in den übrigen hämatopoetischen Zellen bei JAK2-positiven im Vergleich zu JAK2-negativen MPN nachweisen. Dies spricht dafür, dass eine YBX1-Expressionssteigerung kein JAK-2-abhängiges Ereignis ist. Bestätigt wird diese Annahme durch eine YBX1-Expressionssteigerung im Rahmen der ITP, bei welcher ebenfalls keine JAK-2-Mutationen vorliegen. Über welche Mechanismen es zu einer YBX1-Expressionssteigerung bei hämatologischen Erkrankungen kommt und welche Regulationsprozesse beeinflusst werden, sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein. Jayavelu et al. konnten bereits zeigen, dass YBX1 bei JAK2-positiven MPN zur Krankheitspersistenz unter

JAK-Inhibitortherapie über eine Sicherung des Splicings von Mitgliedern des MAPK/ERK-Signalweges beiträgt. Eine YBX1-Inaktivierung führt, wie oben beschrieben, bei sonst therapieresistenten JAK-2-positiven MPN-Zellen zu einer Eradikation (173, 175).

Wie oben angesprochen stellte sich für uns auch die Frage, inwieweit die immunhistochemisch gut nachweisbare, starke YBX1-Überexpression bei der Diagnostik der BCR-ABL-negativen MPN im Vergleich zu benignen Knochenmarkerkrankungen helfen kann. Es wurde daher die ITP im Sinne einer benignen Vergleichsgruppe herangezogen, da es im Rahmen dieser Erkrankung zu einer gesteigerten Megakaryopoese im Knochenmark kommt (2, 19). In unseren Ergebnissen zeigt sich die megakaryozytäre YBX1-Expression im Rahmen der ITP ebenfalls stark erhöht. Bei der ITP besteht in den Zellen der Megakaryopoese in unseren Daten eine mit den MPN vergleichbare, starke YBX1-Überexpression. Eine vermehrte YBX1-Expression ist daher offenbar nicht spezifisch für maligne Knochenmarkerkrankungen, sondern zeigt sich auch bei reaktiven Veränderungen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Gieseler-Halbach et al., die eine nukleäre YBX1-Erhöhung nicht nur in malignen, humanen T-ALL-Zelllinien, sondern auch in aktivierten T-Zellen nachweisen konnten (176). Dies scheint auch bei somatischen Zellen der Fall zu sein. So wurde eine erhöhte YBX1-Expression in Geweben mit erhöhter Proliferationsrate, wie z.B. im Rahmen einer Leberregeneration, nachgewiesen (120).

Bei der CML konnte weder in der megakaryozytären, noch in den übrigen hämatopoetischen Zellreihen eine signifikant gesteigerte YBX1-Expression nachgewiesen werden. Aufgrund der i.d.R. gesteigerten Granulopoese und des meist hyperzellulären Knochenmarkbefundes hätten wir bei der CML eine vermehrte YBX1-Expression in den Zellen der übrigen Hämatopoese erwartet (18). Hier liegt ein scheinbarer Widerspruch gegenüber den Daten von Bhullar et al. vor, welche einen vermehrten YBX1-Nachweis in humanen, myelogenen Leukämiezellen zeigen (163). Dort wurde eine erhöhte YBX1-Expression in K-562-Zellen im Vergleich zu normalen Precursorzellen mittels Westernblot nachgewiesen (163). Die K-562-Zellen wurden zwar einer 53-jährigen Patientin mit CML entnommen, allerdings geschah dies im Stadium der Blastenkrise. K-562-Zellen stellen somit eine etablierte Erythroleukämie-Zelllinie dar (177). Jüngst veröffentlichten Chai et al. ähnliche Ergebnisse (178). Sie wiesen eine erhöhte YBX1-Expression in CD34-positiven Zellen bei der Mehrheit der CML-Patienten nach (178). Bei genauer Betrachtung der Daten fällt jedoch auch hier eine im Rahmen der Blastenkrise besonders gesteigerte YBX1-Expression auf (178). Die Daten von Chai et al. weisen jedoch auf eine essenzielle Rolle von YBX1 bei der Entstehung der CML hin. YBX1 nimmt offenbar Einfluss auf das Zellzyklus-

Fortschreiten und das Umgehen der Apoptose von leukämischen Stammzellen (LSC) im Rahmen der CML (178).

Bei unseren CML-Fällen erfolgte keine Untersuchung des YBX1-Gehalts abhängig vom Erkrankungsstadium und Blastenanteil. In den Blasten der AML konnten wir passend zu den Ergebnissen von Bhullar et al. und Chai et al. eine YBX1-Überexpression nachweisen. Es wären Untersuchungen der YBX1-Expression abhängig vom Stadium der CML und dem Blastenanteil anzuschließen. Die fehlende YBX1-Überexpression bei CML in unseren Ergebnissen zeigt aber auch, dass nicht jeder Prozess mit erhöhter Proliferation zwingend mit einer YBX1-Erhöhung einhergeht.

Die YBX1-Expression nimmt im Rahmen der hämatopoetischen Differenzierung ab. Somit stellte sich für uns die Frage, ob eine erhöhte YBX1-Expression im Rahmen eines MDS, also einer Erkrankung mit hämatopoetischen Ausreifungs- und Differenzierungsstörungen (18, 87, 163), vorliegt. Vor Beginn dieser Dissertationsarbeit wurden erste Daten im Rahmen der oben genannten Pilotstudie bezüglich der YBX1-Expression im Knochenmark von 11 MDS-Fällen erhoben. Ähnlich wie bei den MPN-Fällen zeigte sich eine erhöhte YBX1-Expression. Wir konnten diese YBX1-Überexpression mit einer deutlich größeren Studienpopulation von 61 MDS-Fällen insbesondere in den Zellen der übrigen Hämatopoese, aber auch in den Megakaryozyten, bestätigen. Da es im Rahmen der MDS meist zu einer abnormalen, erythroiden Differenzierung mit atypisch lokalisierter, hyperplastischer Erythropoese kommt, gehen wir davon aus, dass die YBX1-überexprimierenden Zellen vornehmlich der Erythropoese zuzuordnen sind (79, 114). Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von Yokoyama et al., welche eine erhöhte YBX1-Expression in MDS-RA Erythroblasten zeigten (164).

Interessanterweise fand sich, vergleichbar mit den MPN, auch in Knochenmarkbiopsien von MDS-Patienten eine YBX1-Überexpression in den Zellen der Megakaryopoese. Dies deckt sich mit dem bekannten Phänomen einer häufig auftretenden, atypisch lokalisierten, hyperplastischen Megakaryopoese im Knochenmark von MDS-Patienten (179). Lee et al. wiesen bei 5 MDS-Fällen eine YBX1-Überexpression nach, abhängig vom MDS-Typ zeigten sich jedoch sehr unterschiedliche Genexpressionsmuster (114). Daher ist zu vermuten, dass die YBX1-Expression vom MDS-Typ abhängig ist. In unserer Arbeit sind die Fallzahlen der einzelnen MDS-Typen zu gering, um eine verlässliche Aussage diesbezüglich zu treffen. Dies sollte in Folgestudien mit höheren Fallzahlen angeschlossen werden. Auch sollte der Pathomechanismus des YBX1-

Einfluss auf die MDS-Entstehung genauer untersucht werden. Ein in der Literatur beschriebener möglicher Einfluss von YBX1 auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der MDS ist die GATA-1-Interaktion. Der Transkriptionsfaktor GATA-1 ist entscheidend an der Reifung der erythropoetischen Zellreihe beteiligt (180). Ein Genknockdown führt zum Reifungsstopp und zur Transformation von Erythroblasten (181, 182). In einer Studie von Yokoyama et al. konnte in der Milz von GATA-1-Knockdown Mäusen eine erhöhte YBX1-Konzentration nachgewiesen werden (162). Außerdem konnte ein regulierender Einfluss von GATA-1/-2 auf die YBX1-Expression über die 5'UTR-Region des YBX1-Gens demonstriert werden (162). Diese Daten lassen einen Einfluss von YBX1 auf die erythropoetische Zellreifung und auf die Entstehung einer Dyserythropoese bzw. hämatopoetischer Erkrankungen wie den MDS vermuten (162, 164).

Sowohl die MPN als auch die MDS können in eine AML übergehen (69, 85, 87, 88). In dieser Dissertationsarbeit konnten wir anhand von 50 Patienten mit diagnostizierter AML eine deutliche YBX1-Expression zeigen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den YBX1-überexprimierenden Zellen überwiegend um Blasten handelt. Dies deckt sich mit den bereits oben beschriebenen Ergebnissen von Bhullar et al., die eine verstärkte YBX1-Expression in einer Erythroleukämiezelllinie nachwies (163).

Ein Teil unserer Daten ist Bestandteil einer Publikation von Perner et al. (173). Perner et al. konnten nachweisen, dass YBX1 im Rahmen der AML die Translation spezifischer, onkogener Transkripte (z.B. MYC) vermittelt und für die Entstehung und das Fortschreiten der AML erforderlich ist (173). Eine YBX1-Inaktivierung führt zu einer Proliferationsabnahme der leukämischen Zellen, während normale Zellen weitgehend unbeeinflusst bleiben (173). Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer Studie von Liu et al., welche eine wichtige Rolle von YBX1 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der AML über eine Steigerung der MYC-Transkription beschreibt (165). Feng et al. kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass YBX1 für das Überleben der AML-Zellen benötigt wird (183). Eine weitere Rolle scheint YBX1 im Rahmen der NPMc-induzierten leukämischen Transformation hämatopoetischer Zellen im Rahmen der AML-Entstehung zu spielen (184). Eine jüngst veröffentlichte Publikation von Gouda et al. konnte ebenfalls eine erhöhte YBX1-Expression im Knochenmark von AML-Patienten mittels qPCR nachweisen. Gouda et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte YBX1-Expression mit nachteiligen Veränderungen des Genoms sowie einer erhöhten Therapieresistenz und Rezidivrate assoziiert ist. Interessanterweise zeigte sich bei kindlicher AML ein gegensätzliches Bild, hier ging eine erhöhte YBX1-Expression mit einer höheren Rate an vollständiger Remission und einem erhöhten

Gesamtüberleben einher (185). Gegenstand der weiteren Forschung sollte sein, wie YBX1 als therapeutisches Target fungieren könnte.

Wie bereits erwähnt, ist im Bereich der histologischen Knochenmarkbeurteilung durch den Pathologen ein interdisziplinärer Austausch mit den Hämatologen essenziell. Im Bereich der BCR-ABL-negativen MPN zeigt sich eine eindeutige starke YBX1-Färbung der Megakaryozyten. Leider ist diese jedoch nicht spezifisch und ebenfalls im Rahmen einer ITP vorhanden. Ohne genaue Kenntnis des Blutbildes ist die YBX1-Expression deshalb bei MPN schwer einzuordnen, sie kann jedoch bei panzytopenen Patienten und insbesondere zur Abgrenzung einer CML von diagnostischem Nutzen sein. Bei der endgültigen diagnostischen Zuordnung kann die YBX1-Expression aber nur als ein Baustein von vielen genutzt werden. Im Rahmen der MDS-Diagnostik kann insbesondere aufgrund der deutlichen YBX1-Reaktion in den Zellen der übrigen Hämatopoese der immunhistochemische YBX1-Nachweis für den Pathologen durchaus von diagnostischem Nutzen sein. Die im Rahmen der Differenzierungsstörung dysplastisch veränderten Zellen sind durch eine YBX1-Färbung leichter zu differenzieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die durch uns erhobenen Daten eine deutliche, immunhistochemisch nachgewiesene YBX1-Überexpression bei malignen Erkrankungen der Hämatopoese zeigen. Die Analyse eines Datensatzes der Cancer Cell Line Encyclopedia durch Perner et al. wies eine starke YBX1-Überexpression in hämatologischen Malignomen im Vergleich zu anderen Krebszelllinien nach (173, 174). Dies unterstützt die Annahme, dass YBX1 eine entscheidende Rolle im Rahmen der Erkrankungen des hämatopoetischen Systems spielt.

4.1. Diskussion des Patientenkollektivs und des Materials

Die Auswahl der Knochenmarkschnitte erfolgte nach den unter 2.1. genannten Einschlusskriterien. Somit kann das Vorliegen einer MPN-, MDS- bzw. AML-Diagnose als gesichert betrachtet werden. Zum Zeitpunkt der Auswertung lagen leider nicht bei allen Patienten Daten zum JAK2-Mutationsstatus vor. Mit dem Weggang von PD Dr. N. Schröder im Jahr 2014 und von Professor Dr. F. Heidel im Jahr 2015 aus Magdeburg war die Aufarbeitung dieser Daten deutlich erschwert und konnte nicht vervollständigt werden. Beckenkammstanzbiopsien werden nur bei begründetem Verdacht auf eine Knochenmarkerkrankung oder eine Knochenmarkbeteiligung durchgeführt. Somit enthält die Kontrollgruppe auch Patienten mit Blutbildauffälligkeiten aber unauffälliger

Knochenmarkstanze. Da es sich um eine retrospektive Untersuchung handelte, standen keine entsprechenden Proben gesunder Probanden zur Verfügung.

In der Studie wurde FFPE-Gewebe verwendet. Vorteilhaft hierbei ist der gute morphologische Erhalt des Gewebes. Von Nachteil für die Untersuchung könnte jedoch die im Rahmen anderer immunhistochemischer Untersuchungen beobachtete verminderte Reaktivität mit Antikörpern sein. Dieses Problem konnten wir bei unseren YBX1-Untersuchungen jedoch nicht feststellen. Wir sahen im Gegensatz dazu eher sehr ausgeprägte immunhistochemische YBX1-Reaktionen. Möglicherweise wären nach den Erfahrungen anderer Studien beispielsweise Gefrierschnitte ebenfalls gut geeignet. Diese standen jedoch nicht zur Verfügung.

4.2. Diskussion der immunhistochemischen YBX1-Reaktion

Die immunhistochemische YBX1-Reaktion wurde nach dem im Material- und Methodikteil beschriebenen Protokoll durchgeführt. Bei einigen Schnitten wurde eine ungleichmäßige Verteilung des Antikörpers festgestellt. In diesen Fällen färbte sich insbesondere der Randbereich der Schnitte, im mittleren Bereich war die Intensität geringer. Diese Differenzen waren am ehesten auf insuffizientes Spülen während des Färbevorgangs zurückzuführen. Einige Immunreaktionen zeigten eine hohe Hintergrundfärbung, welche möglicherweise auf eine insuffiziente Blockierung des endogenen Biotins zurückzuführen ist. In beiden Fällen wurden erneute immunhistochemische YBX1-Reaktionen durchgeführt, bei wiederholt schlechter Qualität fielen die Fälle aus der Studie heraus. Gegebenenfalls hätte in diesen Fällen eine weitere Wiederholung der YBX1-Reaktion durchgeführt werden können.

Es existiert eine Vielzahl an YBX1-Antikörpern, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind (102). Die Datenlage bezüglich der intrazellulären YBX1-Konzentration, der YBX1-Expression und seiner prognostischen Bedeutung unterscheidet sich in den verschiedenen Studien (102). Hinsichtlich der Frage, ob normales Gewebe YBX1 exprimiert oder nicht, gibt es ebenfalls unterschiedliche Auffassungen (102). Auffallend ist, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche YBX1-Antikörper oder Färbeprotokolle verwendet wurden (102). So wiesen beispielsweise Dahl et al. (186) beim Mammakarzinom eine Korrelation der nukleären YBX1-Detektion mit einem reduzierten Gesamtüberleben nach. Wu et al. (187) hingegen zeigten diesen Zusammenhang bei der zytoplasmatischen YBX1-Detektion. In den beiden Studien wurden gegen jeweils unterschiedlich Epitope gerichtete YBX1-Antikörper verwendet (102, 186, 187). In einer Studie von Woolley et al. wurden drei YBX1-Antikörper, die sich gegen unterschiedliche Epitope

richteten, verglichen (188). Alle drei zeigten unterschiedliche Färbemuster im gleichen Gewebe (188). Erklärt wurde dies mit der differierenden Zugänglichkeit der drei Epitope aufgrund der Struktur der YBX1-Komplexe (188). Außerdem zeigte einer der Antikörper Kreuzreaktionen mit hnRNP A1, einem anderen nukleären Protein (188). Einer der beiden anderen Antikörper war gegen ein C-, der andere gegen ein N-terminales Epitop gerichtet (188). Beide zeigten eine erhöhte zytoplasmatische YBX1-Expression in Brustkrebszellen, jedoch war der YBX1-Gehalt bei Verwendung des gegen das N-terminale Epitop gerichteten Antikörpers höher (188). Außerdem konnte hier im Gegensatz zu dem gegen das C-terminale Epitop gerichteten Antikörper eine erhöhte nukleäre YBX1-Expression nachgewiesen werden (188). Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper richtet sich gegen ein C-terminal gelegenes Epitop. Laut der Studie von Woolley et al. färben jedoch Antikörper gegen das N-terminale Epitop YBX1 suffizienter an, insbesondere das nukleäre (188). In unseren YBX1-Färbungen wurde bis auf wenige Ausnahmen vorwiegend zytoplasmatisches YBX1 gefunden. Es wären Untersuchungen mit einem Antikörper anzuschließen, der eine höhere Affinität zu nukleärem YBX1 hat, um die Expression lokalisationsabhängig zu untersuchen. Insbesondere hinsichtlich des YBX1-Expressionsvergleichs bei MPN und ITP wäre interessant, ob ein N-terminal-gerichteter YBX1-Antikörper ggf. Unterschiede detektieren würde und möglicherweise spezifischer für MPN wäre. Insgesamt wäre für die Zukunft zur besseren Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien eine Standardisierung des YBX1-Antikörpers und des Färbeprotokolls zu empfehlen.

4.3. Diskussion der histologischen Auswertung

Die histologische Auswertung wurde von einem erfahrenen Pathologen und der Verfasserin dieser Dissertationsarbeit gemeinsam durchgeführt. Zur Gewährleistung einer neutralen Beurteilung erfolgte die Auswertung randomisiert in zufälliger Reihenfolge ohne Kenntnis der vorliegenden Diagnose. Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktion anhand des IRS nach Remmele stellt ein semiquantitatives Verfahren dar und ist somit immer auch untersucherabhängig. Selbstverständlich erfolgte vor der Auswertung eine Schulung bezüglich des Vergleichs der unterschiedlichen Färbeintensitäten. Fehler können hier jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, zumal die histologische Auswertung an unterschiedlichen Tagen stattfand. Um eine subjektive Komponente bei der Einschätzung der Färbeintensität und dem Anteil gefärbter Zellen insbesondere in Abgrenzung zur Hintergrundfärbung weiter zu minimieren, wäre eine Zweitbeurteilung durch einen weiteren unabhängigen Pathologen mit anschließender Mittelung der Ergebnisse zu überlegen. Allerdings ist aufgrund der Beurteilung durch einen Pathologen von

einer geringen Varianz der Ergebnisse auszugehen, zumal die Auswertung in größeren Sitzungen, in welchen zahlreiche Fälle (ca. 40) hintereinander beurteilt wurden, stattfand.

Um die Objektivität weiter zu steigern, wäre eine quantitative PCR (qPCR) zur Messung der YBX1-Genexpression beispielhaft für einige Patienten denkbar. Mittels qPCR können in einer Probe enthaltene Nukleinsäuren nachgewiesen und quantifiziert werden. Die qPCR sollte anhand zugehöriger Knochenmarkpunktate erfolgen, konnte jedoch mangels ausreichenden Materials nicht durchgeführt werden. Es gab auch Überlegungen, die qPCR anhand der vorhandenen FFPE-Blöcke durchzuführen. Da es sich hierbei um eine sehr arbeits- und kostenintensive Methode handelt, wurde diese jedoch auch aufgrund des Weggangs von PD Dr. Schröder aus Magdeburg nicht durchgeführt. Eine YBX1-Quantifizierung mittels der objektiveren qPCR-Methode wäre für zukünftige Studien sicherlich interessant.

Im Rahmen unserer Arbeit wurden die Zellen der Megakaryopoese gesondert betrachtet. Bezüglich der Zellen der übrigen Hämatopoese erfolgte keine genaue Differenzierung. Wir können also nicht sicher sagen, ob es sich bei den YBX1-überexprimierenden Zellen um Zellen der Erythropoese, Granulopoese, Monozytopoese oder um Blasten handelt. Es lässt sich nur mutmaßen, dass im Rahmen der MPN eine YBX1-Überexpression am ehesten in der Zellreihe mit einer Proliferationszunahme, wie beispielsweise der Erythropoese bei der PV, vorliegt. Beim MDS wäre eine starke Expressionssteigerung in den Blasten wie bei der AML denkbar. Da im Rahmen des MDS der Blastenanteil jedoch unter 20 % liegt (18), ist davon auszugehen, dass höchstwahrscheinlich die Zellen der Erythropoese, welche im Rahmen des MDS oft betroffen ist, vermehrt YBX1 exprimieren (18). Es wäre in einer Folgestudie zu überprüfen, um welche YBX1-exprimierende Zellreihe der übrigen Hämatopoese es sich genau handelt.

Laut VENTANA sollte die histologische Auswertung innerhalb von zwei bis drei Tagen nach Färbung erfolgen. Diese zeitliche Vorgabe konnte aus organisatorischen Gründen nicht für alle gefärbten Objektträger eingehalten werden. Allerdings wurden die Schnitte nach Vorgabe des Herstellers zwischen 15 und 25 °C gelagert. Laut VENTANA sollte die Färbung dann mindestens zwei Jahre lang stabil sein. Dieses Vorgehen ist in der Pathologie üblich und sollte zu keiner Verzerrung der Ergebnisse führen.

4.4. Diskussion der statistischen Auswertung

Die statische Auswertung erfolgte vollständig in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und medizinische Informatik der medizinischen Fakultät Magdeburg. Der Tatsache, dass die gemessenen Werte keiner Normalverteilung entsprechen, wurde durch den Einsatz nicht-parametrischer Testverfahren begegnet. Bei einigen Stichproben, insbesondere bei den Vergleichen innerhalb einer Gruppe (z.B. MPN) konnte leider nur eine geringe Fallzahl erreicht werden. Diese Problematik spiegelt sich in eher zurückhaltend zu bewertenden statistischen Ergebnissen wieder. Eine fehlende Signifikanz kann sowohl durch tatsächliches Nichtvorhandensein, jedoch auch durch eine zu geringe Fallzahl erklärt werden. Um dem Rechnung zu tragen, sollte die Studie mit einer höheren Fallzahl wiederholt werden. Aufgrund des Problems des multiplen Testens wurde bei Vergleich von mehr als zwei Stichproben ein Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau angewandt. Diese Methode zählt zu den konservativen statistischen Verfahren. Dies hat den Nachteil, dass die Wahrscheinlichkeit, ein signifikantes Ergebnis zu erreichen, an sehr große Unterschiede zwischen den Gruppen geknüpft ist. Vorteilhaft ist jedoch, dass verglichen mit progressiveren Testungen weniger falsch positive Ergebnisse entstehen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Y-Box-bindenden Proteins 1 (YBX1) im Knochenmark bei Patienten mit Myeloproliferativen Neoplasien (MPN), Myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuten myeloischen Leukämien (AML) untersucht. Die YBX1-Expression wurde anhand immunhistochemischer YBX1-Reaktionen mittels IRS nach Remmele semiquantitativ bestimmt. Bei MPN wurde eine deutliche YBX1-Überexpression insbesondere in den Megakaryozyten ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test) nachgewiesen. Im Folgenden wurden die MPN-Subtypen gesondert betrachtet. Bei der Polycythaemia vera (PV), der essenziellen Thrombozythämie (ET) und der primären Myelofibrose (PMF) konnte eine starke immunhistochemische Reaktion auf YBX1-Antikörper in den Zellen der Megakaryopoese nachgewiesen werden. Somit liegt eine deutliche YBX1-Überexpression vor ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test). Im Gegensatz dazu ist das megakaryozytäre YBX1-Expressionsniveau der chronisch myeloischen Leukämie (CML), welche auch eine andere Pathogenese aufweist und durch eine BCR-ABL-Mutation verursacht wird, nicht signifikant erhöht ($p 0,253$, Kruskal-Wallis-Test).

Zur Spezifitätsanalyse der YBX1-Expression in der Megakaryopoese wurde die Immuntrombozythopenie (ITP) als Erkrankung mit ebenfalls gesteigerter Megakaryopoese herangezogen. Die ITP-Kontrollgruppe weist in den Zellen der Megakaryopoese eine mit den MPN-Fällen vergleichbar hohe YBX1-Expression auf ($p 0,302$, Mann-Witney-U-Test). Eine Abhängigkeit der YBX1-Überexpression vom JAK2-Mutationsstatus ließ sich nicht belegen (Megakaryopoese $p 0,375$, übrige Hämatopoese $p 0,059$, Mann-Witney-U-Test). Die YBX1-Expression in anderen hämatopoetischen Zellreihen bei MPN ist ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas gesteigert ($p 0,038$, Mann-Whitney-U-Test). Bei Einzelbetrachtung der Krankheitsentitäten ist diese Überexpression jedoch ausschließlich bei der PV im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant (PV $p 0,004$, Kruskal-Wallis-Test).

Bei MDS liegt eine signifikante YBX1-Überexpression in allen Zellen der Hämatopoese vor (Megakaryopoese $p 0,007$, übrige Hämatopoese $p < 0,001$, Mann-Witney-U-Test). Auch die Zellen der AML exprimieren signifikant mehr YBX1 als die Kontrollgruppe (Megakaryopoese $p 0,032$, übrige Hämatopoese $p < 0,001$, Mann-Witney-U-Test).

Diese Daten weisen auf einen Einfluss von YBX1 in der Entstehung hämatopoetischer Erkrankungen hin. Darüber hinaus könnte die immunhistochemische Bestimmung von YBX1 die Diagnostik solcher Erkrankungen erleichtern. Inwieweit YBX1 als therapeutische Zielstruktur fungieren kann, sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

1. Neumann E, Cohnheim J, Hueter C, Kühne W: Ueber die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung. Centralblatt für die medizinischen Wissenschaften. 1868. 44: Titelblatt
2. Tzankov A, Dirnhofer S, Beham-Schmid C.: Normales Knochenmark und häufige reaktive Veränderungen. Pathologe. 2012. 33(6): 496–507
3. Brown D, Gatter K, Natkunam Y, Warnke R: Knochenmarksdiagnostik. 1. Auflage. Bern. Hans Huber, Hofgrete AG. Bern. 2008. 5–19
4. Herold G: Innere Medizin 2016. Gerd Herold. Köln. 2015. 27
5. Bain BJ: Bone marrow trephine biopsy. J Clin Pathol. 2001. 54(10): 737–742
6. Seiler T, Dreyling M: Knochenmarkhistologie aus klinischer Sicht. Pathologe 2012. 33(6): 490–495
7. Quintanilla-Martinez L, Tinguely M, Bonzheim I, Fend F: Knochenmarkbiopsie: Aufarbeitung und Einsatzmöglichkeiten molekularpathologischer Methoden. Pathologe 2012. 33(6): 481–489
8. Wilkins BS: Pitfalls in bone marrow pathology: avoiding errors in bone marrow trephine biopsy diagnosis. J Clin Pathol. 2011. 64(5): 380–386
9. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A: European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Haematologica. 2005. 90(8): 1128–1132
10. Fend F: Knochenmarkdiagnostik: Integrative Befundung ist Pflicht. Pathologe. 2012. 33(6): 479–480
11. Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Laporte JR: Population-Based Drug-Induced Agranulocytosis. Arch Intern Med. 2005. 165(8): 869–874
12. Bartakke S, Abdelhaleem M, Carcao M: Valproate-induced pure red cell aplasia and megakaryocyte dysplasia. Br J Haematol. 2008. 141(2): 133
13. McMillan R: The Pathogenesis of Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura. Semin Hematol. 2007. 44(5): 3–11.
14. Herold G: Innere Medizin 2014. Gerd Herold. Köln. 2013. 101-108
15. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prechal JF, Steinmann L: Polycythemia Vera: Stem-Cell and Probable Clonal Origin of the Disease. N Engl J Med. 1976. 295(17): 913–916

16. Dameshek W: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951. 6(4): 372–375
17. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes [editorial]. *Blood*. 1951. 6(4): 372-375. *Blood*. 2016. 127(6): 663
18. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. 127(20): 2391–2405
19. Vardiman JW: Chronic Myelogenous Leukemia, BCR-ABL1+. *Am J Clin Pathol*. 2009. 132(2): 250–260
20. Rohrbacher M, Hasford J: Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009. 22(3): 295–302
21. Hochhaus A, Baerlocher GM, Brümmendorf TH, Chalandon Y, Dölken G, Thiede G, Wolf D, le Coutre P: Chronische Myeloische Leukämie (CML) - Leitlinie DGHO. *Onkopedia*. 2013 [zitiert 23. März 2017]. verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml>
22. Nowell PC, Hungerford DA: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960. 25: 85–109
23. Nowell PC: The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962. 8: 65–66
24. Rowley JD: A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973. 243 (5405): 290–293
25. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E: Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985. 315(6020): 550–554
26. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990. 247(4946): 1079–1082
27. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007. 370(9584): 342–350
28. Daley GQ, Baltimore D: Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. 85(23): 9312–9316
29. Gishizky ML, Johnson-White J, Witte ON: Efficient transplantation of BCR-ABL-induced chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993. 90(8): 3755–3759

30. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM.: Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol.* 1997. 96(1): 111–116
31. Craigie D, Bennett JH: Two Cases of Disease and Enlargement of the Spleen, in Which Death Took Place from the Presence of Purulent Matter in the Blood. *Edinb Med Surg J.* 1845. 64(165): 400–423
32. Spiers A, Bain B, Turner JE: The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia-positive cases. *Scand J Haematol.* 1977. 18(1): 25-38
33. Schmitt-Graeff AH: Chronische myeloische Neoplasien: Diagnostische Kriterien und Ausblick auf aktuelle Therapiekonzepte. *Pathologe.* 2010. 31(1): 29–41
34. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Zirbes TK, Birnbaum F, Kressmann C, Melguizo-Grahmann M, Frackenpohl H, Sprungmann C, Leder LD, Diehl V, Zankovich R, Schaefer HE, Niederle N, Fischer R: Bone marrow features and clinical findings in chronic myeloid leukemia--a comparative, multicenter, immunohistological and morphometric study on 614 patients. *Leuk Lymphoma.* 2000. 36(3–4): 295–308
35. Johansson P.: Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32(3): 171–173
36. GISP - Gruppo Italiano Studio Policitemia: Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med.* 1995. 123(9): 656–664
37. Byun JM, Kim YJ, Youk T, Yang JJ, Yoo J, Park TS. Real world epidemiology of myeloproliferative neoplasms: a population based study in Korea 2004–2013. *Ann Hematol.* 2017. 96(3): 373–381
38. Prchal JF, Axelrad AA.: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N Engl J Med.* 1974. 290(24):1382
39. Cotes PM, Doré CJ, Yin JA, Lewis SM, Messinezy M, Pearson TC, Reid C: Determination of serum immunoreactive erythropoietin in the investigation of erythrocytosis. *N Engl J Med.* 1986. 315(5): 283–287
40. Fisher MJ, Prchal JF, Prchal JT, D'Andrea AD: Anti-erythropoietin (EPO) receptor monoclonal antibodies distinguish EPO-dependent and EPO-independent erythroid progenitors in polycythemia vera. *Blood.* 1994. 84(6):1982–1991
41. Fanger H, Cella LJ, Litchman H: Thrombocythemia; report of three cases and review of literature. *N Engl J Med.* 1954. 250(11): 456–461
42. Chuzi S, Stein BL: Essential thrombocythemia: a review of the clinical features, diagnostic challenges, and treatment modalities in the era of molecular discovery. *Leuk Lymphoma.* 2017. 58(12): 2786–2798
43. Li Y, Hetet G, Maurer AM, Chait Y, Dhermy D, Briere J: Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies

- against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br J Haematol.* 1994. 87(3): 471–476
44. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti MC, Ricci P, Vianelli N, Gianni L, Zuffa E, Aloe Spiriti MA, Latagliata R: Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol.* 1990. 75(1): 4–9
 45. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, Lierman E, Devos T, Graux C, Hervent AS, Emmerechts J, Tousseyn T, De Paepe P, Papadopoulos P, Michaux L, Vandenberghe P: Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica.* 2015. 100(7): 893–897
 46. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M: A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia.* 2010. 24(9): 1574–1579
 47. Tefferi A, Vainchenker W: Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol.* 2011. 29(5): 573–582
 48. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005. 434(7037):1144–1148
 49. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O: Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000. 20(10): 3387–3395
 50. Saharinen P, Silvennoinen O: The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem.* 2002. 277(49): 47954–47963
 51. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC: Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood.* 2008. 111(8): 3931–3940
 52. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Sprechia G, Lo-Coco F, Delaini F, Villani L, Finotto S, Ammatuna E, Alterini R, Carrai V, Capacciolo G, Di Lollo S, Lisa V, Rambaldi A, Bosi A, Barbui T: Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood.* 2008. 112(3): 844–847
 53. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR: MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood.* 2008. 112(1): 141–149

54. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R: Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2013. 369(25): 2379–2390
55. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL: MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med.* 2006. 3(7): e270
56. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, Villeval JL, Raslova H, Kralovics R, Constantinescu SN, Plo I, Vainchenker W: Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood.* 2016. 127(10): 1317–1324
57. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T: Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia.* 2007; 21(9): 1952–1959
58. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Elena C, I Casetti IC, Milanese C, Sant'Antonio E, Bellini M, Fugazza E, Renna MC, Boveri E, Astori C, Pascutto C, Kralovics R, Cazzola M: JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood.* 2014. 123(10): 1544–1551
59. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA,: Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N Engl J Med.* 2009. 360(22): 2289–2301
60. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, Vainchenker W, Bernard OA, Chaffanet M, Vey N, Birnbaum D, Mozziconacci MJ: Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2009. 23(11): 2183–2186
61. Green A, Beer P: Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2010. 362(4): 369–370
62. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, Passamonti F, Andreasson B, Ferrari ML, Rambaldi A, Samuelsson J, Birgegard G, Tefferi A, Harrison CN, Radia D, Mesa RA: The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): International Prospective Validation and Reliability Trial in 402 patients. *Blood.* 2011. 118(2): 401–408
63. Siegel FP, Tauscher J, Petrides PE: Aquagenic pruritus in polycythemia vera: Characteristics and influence on quality of life in 441 patients. *Am J Hematol.* 2013. 88(8): 665–669

64. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M: Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med.* 2004. 117(10): 755–761
65. Petrides, Petro E., Gabriela M. Baerlocher, Heinz Gisslinger, Martin Griebßhammer, Eva Lengfelder: Essentielle (oder primäre) Thrombozythämie (ET). 2014 [zitiert 24. März 2017]. verfügbar unter: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/essentielle-oder-primae-re-thrombozythaemie-et/@@view/html/index.html>
66. Budde U, van Genderen PJ: Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost.* 1997. 23(5): 425–431
67. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A: Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc.* 2006. 81(2): 159–166
68. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, Vannucchi AM, Mesa RA, Demory JL, Barosi G, Rumi E, Tefferi A: New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009. 113(13): 2895–2901
69. Cervantes F, Tassies D, Salgado C, Rovira M, Pereira A, Rozman C: Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. *Acta Haematol.* 1991. 85(3): 124–127
70. Hulcrantz M, Wilkes SR, Kristinsson SY, Andersson TML, Derolf ÅR, Eloranta S, Samuelsson J, Landgren O, Dickman PW, Lambert PC, Björkholm M: Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. *J Clin Oncol.* 2015. 33(20): 2288–2295
71. Heaney ML, Soriano G: Acute myeloid leukemia following a myeloproliferative neoplasm: clinical characteristics, genetic features and effects of therapy. *Curr Hematol Malig Rep.* 2013. 8(2):116–122
72. Bhatia S: Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* 2013. 40(6): 666-675
73. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, Vardiman JW, Rowley JD, Larson RA: Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood.* 2003. 102(1): 43–52
74. Irons RD, Gross SA, Le A, Wang XQ, Chen Y, Ryder J, Schnatter AR: Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure. *Chem Biol Interact.* 2010. 184(1–2): 30–38
75. Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, Amenomori T, Yamamura M, Yoshida Y, Koba T, Miyazaki Y, Matsuo T, Preston DL, Suyama A, Kodama K, Tomonaga M: Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing

- radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *J Clin Oncol*. 2011. 29(4): 428–434
76. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, Germing U: Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. *Leuk Res*. 2011. 35(12):1591–1596
 77. Shumilov E, Flach J, Kohlmann A, Banz Y, Bonadies N, Fiedler M, Pabst T, Bacher U: Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. *Blood Rev*. 2018. 32(6): 508–519
 78. Tricot G, De Wolf-Peeters C, Vlietinck R, Verwilghen RL: Bone marrow histology in myelodysplastic syndromes. II. Prognostic value of abnormal localization of immature precursors in MDS. *Br J Haematol*. 1984. 58(2):217–225
 79. Schmitt-Graeff AH, Müller MJ, Fisch P: Myelodysplastische Syndrome: Epidemiologie, molekulare und morphologische Merkmale, Risikostratifizierung. *Pathologe*. 2013. 34(1): 45–55
 80. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kundgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AAN, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C: 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. 110(13): 4385–4395
 81. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL: Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011. 364(26): 2496–2506
 82. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HO, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S: Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014. 28(2): 241–247
 83. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011. 478(7367): 64–69
 84. Patnaik MM, Hanson CA, Sulai NH, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Lasho TL, Tefferi A: Prognostic irrelevance of ring sideroblast percentage in World Health Organization-defined myelodysplastic syndromes without excess blasts. *Blood*. 2012. 119(24): 5674–5677
 85. Hamilton-Paterson JL. Pre-leukaemic anaemia. *Acta Haematol*. 1949. 2(5): 309–316
 86. Narayanan S: Clinical, hematological, and cytogenetic profile of adult myelodysplastic

- syndrome in a tertiary care center. *J Blood Med*. 2017. 8: 21–27
87. Block M, Jacobson LO, Bethard WF: Preleukemic acute human leukemia. *J Am Med Assoc*. 1953. 152(11): 1018–1028
 88. Koeffler HP, Leong G: Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia*. 2017. 31(3): 534–542
 89. Pelcovits A, Niroula R: Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020. 103(3): 38–40
 90. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD: Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017. 129(4): 424–447
 91. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SMM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D: Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012. 120(12): 2454–2465
 92. Pati H, Kundil Veetil K: Myelodysplastic Syndrome/Myeloproliferative Neoplasm (MDS/MPN) Overlap Syndromes: Molecular Pathogenetic Mechanisms and Their Implications. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2019. 35(1): 3–11
 93. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD: The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009. 114(5): 937–951
 94. Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M, Schwartz BD: Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. 85(19): 7322–7326
 95. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M: The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*. 2003. 25(7): 691–698
 96. Hasegawa SL, Doetsch PW, Hamilton KK, Martin AM, Okenquist SA, Lenz J, Boss JM: DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(18): 4915–4920
 97. Murray MT, Schiller DL, Franke WW: Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89(1): 11–15
 98. Kolluri R, Torrey TA, Kinniburgh AJ: A CT promoter element binding protein: definition

- of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(1): 111–116
99. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN: Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2011. 76(13): 1402–1433
 100. Wistow G: Cold shock and DNA binding. *Nature*. 1990. 344(6269): 823–824
 101. Jiang W, Hou Y, Inouye M: CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem*. 1997. 272(1): 196–202
 102. Kosnopfel C, Sinnberg T, Schitteck B: Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy. *Eur J Cell Biol*. 2014. 93(1–2): 61–70
 103. Toh S, Nakamura T, Ohga T, Koike K, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M, Kohno K: Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene*. 1998. 206(1): 93–97
 104. Makino Y, Ohga T, Toh S, Koike K, Okumura K, Wada M, Kuwano M, Kohno K: Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(10): 1873–1878
 105. Wolffe AP: Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*. 1994. 16(4): 245–251
 106. Tafuri SR, Wolffe AP: *Xenopus* Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. 87(22): 9028–9032
 107. Kloks CPAM, Spronk CAEM, Lasonder E, Hoffmann A, Vuister GW, Grzesiek S, Hilbers CW: The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J Mol Biol*. 2002. 316(2): 317–326
 108. Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M, Familiari M: The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol*. 1992. 4(4): 290–298
 109. Landsman D: RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(11): 2861–2864
 110. Koike K, Uchiumi T, Ohga T, Toh S, Wada M, Kohno K, Kuwano M: Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett*. 1997. 417(3): 390–394
 111. Sutherland BW, Kucab J, Wu J, Lee C, Cheang MCU, Yorida E, Turbin D, Dedhar S, Nelson C, Pollak M, Grimes HL, Miller K, Badve S, Huntsman D, Blake-Gilks C, Chen M, Pallen CJ, Dunn SE: Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells. *Oncogene*. 2005. 24(26): 4281–4292
 112. Ozer J, Faber M, Chalkley R, Sealy L: Isolation and characterization of a cDNA clone for

- the CCAAT transcription factor EFIA reveals a novel structural motif. *J Biol Chem.* 1990. 265(36): 22143–22152
113. Izumi H, Imamura T, Nagatani G, Ise T, Murakami T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Yoshida Y, Nomoto M, Okamoto T, Uchiumi T, Kuwano M, Funa K, Kohno K: Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29(5): 1200–1207
 114. Lee YT, Miller LD, Gubin AN, Makhlof F, Wojda U, Barrett AJ, Liu ET, Miller JL: Transcription patterning of uncoupled proliferation and differentiation in myelodysplastic bone marrow with erythroid-focused arrays. *Blood.* 2001. 98(6): 1914–1921
 115. Stenina OI, Shaneyfelt KM, DiCorleto PE: Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: A mechanism of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(13): 7277–7282
 116. Lasham A, Print CG, Woolley AG, Dunn SE, Braithwaite AW. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? *Biochem J.* 2013. 449(1): 11–23
 117. Fujita T, Ito K ichi, Izumi H, Kimura M, Sano M, Nakagomi H, Maeno K, Hama Y, Shingu K, Tsuchiya A, Kohno K, Fujimori M: Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2005. 11(24 Pt 1): 8837–8844
 118. Das S, Chattopadhyay R, Bhakat KK, Boldogh I, Kohno K, Prasad R, Wilson SH, Hazra TK: Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress. *J Biol Chem.* 2007. 282(39): 28474–28484
 119. Frye BC, Halfter S, Djudjaj S, Muehlenberg P, Weber S, Raffetseder U, En-Nia A, Knott H, Baron JM, Dooley S, Bernhagen J, Mertens PR: Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen. *EMBO Rep.* 2009. 10(7): 783–789
 120. Grant CE, Deeley RG: Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol Cell Biol.* 1993. 13(7): 4186–4196
 121. Lu ZH, Books JT, Ley TJ: YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2005. 25(11): 4625–4637
 122. Stratford AL, Habibi G, Astanehe A, Jiang H, Hu K, Park E, Shadeo A, Buys TPH, Lam W, Pugh T, Marra M, Nielsen TO, Klinge U, Mertens PR, Aparicio S, Dunn SE: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy. *Breast Cancer Res.* 2007. 9(5): R61
 123. Finkbeiner MR, Astanehe A, To K, Fotovati A, Davies AH, Zhao Y, Jiang H, Stratford AL, Shadeo A, Boccaccio C, Comoglio P, Mertens PR, Eirew P, Raouf A, Eaves CJ, Dunn SE: Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor

- regulation in normal and malignant human mammary cells. *Oncogene*. 2009. 28(11): 1421–1431
124. Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, Dobbyn HC, Hayes C, de Moor CH, Lilley KS, Bushell M, Willis AE: Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-transacting factors for the Myc family of IRESs. *Mol Cell Biol*. 2008. 28(1): 40–49
 125. Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, Piaggio G, Fietze E, Dietel M, Royer HD: YB-1 as a Cell Cycle-regulated Transcription Factor Facilitating Cyclin A and Cyclin B1 Gene Expression. *J Biol Chem*. 2003. 278(30): 27988–27996
 126. Stein U, Jürchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer HD: Hyperthermia-induced Nuclear Translocation of Transcription Factor YB-1 Leads to Enhanced Expression of Multidrug Resistance-related ABC Transporters. *J Biol Chem*. 2001. 276(30): 28562–28569
 127. Mertens PR, Alfonso-Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH: A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J Biol Chem*. 1998. 273(49): 32957–32965
 128. Asakuno K, Kohno K, Uchiumi T, Kubo T, Sato S, Isono M, Kuwano M: Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. 199(3): 1428–1435
 129. Lasham A, Lindridge E, Rudert F, Onrust R, Watson J: Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene*. 2000. 252(1–2): 1–13
 130. Lasham A, Moloney S, Hale T, Homer C, Zhang YF, Murison JG, Braithwaite AW, Watson J: The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*. 2003. 278(37): 35516–35523
 131. Coles LS, Diamond P, Lambrusco L, Hunter J, Burrows J, Vadas MA, Goodall GJ: A novel mechanism of repression of the vascular endothelial growth factor promoter, by single strand DNA binding cold shock domain (Y-box) proteins in normoxic fibroblasts. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30(22): 4845–4854
 132. Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R: Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 99(26): 16719–16724
 133. Minich WB, Ovchinnikov LP: Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie*. 1992. 74(5): 477–483
 134. Evdokimova VM, Wei CL, Sitikov AS, Simonenko PN, Lazarev OA, Vasilenko KS, Ustinov VA, Hershey JW, Ovchinnikov LP: The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family. *J Biol Chem*. 1995. 270(7): 3186–3192
 135. Evdokimova VM, Kovrigina EA, Nashchekin DV, Davydova EK, Hershey JWB, Ovchinnikov LP: The Major Core Protein of Messenger Ribonucleoprotein Particles

- (p50) Promotes Initiation of Protein Biosynthesis in Vitro. *J Biol Chem.* 1998. 273(6): 3574–3581
136. Evdokimova V, Ruzanov P, Imataka H, Raught B, Svitkin Y, Ovchinnikov LP, Sonenberg N: The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J.* 2001. 20(19): 5491–5502
137. Gaudreault I, Guay D, Lebel M: YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32(1): 316–327
138. Ise T, Nagatani G, Imamura T, Kato K, Takano H, Nomoto M, Izumi H, Ohmori H, Okamoto T, Ohga T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K: Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res.* 1999. 59(2): 342–346
139. Bergmann S, Royer-Pokora B, Fietze E, Jürchott K, Hildebrandt B, Trost D, Leenders F, Claude JC, Theuring F, Bargou R, Dietel M, Royer HD: YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification. *Cancer Res.* 2005. 65(10): 4078–4087
140. Bargou RC, Jürchott K, Wagener C, Bergmann S, Metzner S, Bommert K, Mapara MY, Winzer KJ, Dietel M, Dörken B, Royer HD: Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat Med.* 1997. 3(4): 447–450
141. Kamura T, Yahata H, Amada S, Ogawa S, Sonoda T, Kobayashi H, Mitsumoto M, Kohno K, Kuwano M, Nakano H: Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer.* 1999. 85(11): 2450–2454
142. Shibahara K, Sugio K, Osaki T, Uchiumi T, Maehara Y, Kohno K, Yasumoto K, Sugimachi K, Kuwano M: Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001. 7(10): 3151–3155
143. Yasen M, Kajino K, Kano S, Tobita H, Yamamoto J, Uchiumi T, Kon S, Maeda M, Obulhasim G, Arie S, Hino O: The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005. 11(20): 7354–7361
144. Chatterjee M, Rancso C, Stühmer T, Eckstein N, Andrulis M, Gerecke C, Lorentz H, Royer HD, Bargou RC: The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood.* 2008. 111(7): 3714–3722
145. Sinnberg T, Sauer B, Holm P, Spangler B, Kuphal S, Bosserhoff A, Schitteck B: MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop. *Exp Dermatol.* 2012. 21(4): 265–270

146. Szczuraszek K, Halon A, Materna V, Mazur G, Wrobel T, Kuliczkowski K, Donizy P, Holm PS, Lage H, Surowiak P: Elevated YB-1 expression is a new unfavorable prognostic factor in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res.* 2011. 31(9): 2963–2970
147. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. 100(1) :57–70
148. Lee C, Dhillon J, Wang MYC, Gao Y, Hu K, Park E, Astanehe A, Hung MC, Eirew P, Eaves CJ, Dunn SE: Targeting YB-1 in HER-2 overexpressing breast cancer cells induces apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2008. 68(21): 8661–8666
149. Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwäble J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H: Constitutive Activation of Akt by Flt3 Internal Tandem Duplications Is Necessary for Increased Survival, Proliferation, and Myeloid Transformation. *Cancer Res.* 2005. 65(21): 9643–9650
150. Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol.* 1991. 11(2): 1107–1113
151. Bartalucci N, Guglielmelli P, Vannucchi AM: Rationale for targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013. 13(2): 307-309
152. Vannucchi AM, Bogani C, Bartalucci N, Tozzi L, Martinelli S, Guglielmelli P, Paoli C, Pieri L, Bosi A: Inhibitors of PI3K/Akt and/or mTOR Inhibit the Growth of Cells of Myeloproliferative Neoplasms and Synergize with JAK2 Inhibitor and Interferon,. *Blood.* 2011. 118(21): 3835
153. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, Marchioli R, Masciulli A, Tozzi L, Biamonte F, Bartalucci N, Gattoni E, Lupo ML, Finazzi G, Pancrazzi A, Antoniolo E, Susini MC, Pieri L, Malevolti E, Usala E, Occhini U, Grossi A, Caglio S, Paratore S, Bosi A, Barbui T, Vannucchi AM: Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood.* 2011. 118(8): 2069–2076
154. Astanehe A, Finkbeiner MR, Hojabrpour P, To K, Fotovati A, Shadeo A, Stratford AL, Lam WL, Berquin IM, Duronio V, Dunn SE: The transcriptional induction of PIK3CA in tumor cells is dependent on the oncoprotein Y-box binding protein-1. *Oncogene.* 2009. 28(25): 2406–2418
155. Holm PS, Bergmann S, Jürchott K, Lage H, Brand K, Ladhoff A, Mantwill K, Curiel DT, Döbelstein M, Dietel M, Gansbacher B, Royer HD: YB-1 Relocates to the Nucleus in Adenovirus-infected Cells and Facilitates Viral Replication by Inducing E2 Gene Expression through the E2 Late Promoter. *J Biol Chem.* 2002. 277(12): 10427–10434
156. Bader AG, Felts KA, Jiang N, Chang HW, Vogt PK: Y box-binding protein 1 induces resistance to oncogenic transformation by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. 100(21): 12384–12389
157. Stiewe T: The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007.

7(3): 165–167

158. Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M, Kohno K: Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene*. 2000. 19(54): 6194–6202
159. Homer C, Knight DA, Hananeia L, Sheard P, Risk J, Lasham A, Royds JA, Braithwaite AW: Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene*. 2005. 24(56): 8314–8325
160. Coles LS, Lambrusco L, Burrows J, Hunter J, Diamond P, Bert AG, Vadas MA, Goodall GJ: Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett*. 2005. 579(24): 5372–5378
161. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov LP, Davicioni E, Triche TJ, Sorensen PHB: Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell*. 2009. 15(5): 402–415
162. Yokoyama H, Harigae H, Takahashi S, Takahashi S, Furuyama K, Kaku M, Yamamoto M, Sasaki T: Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 303(1): 140–145
163. Bhullar J, Sollars VE: YBX1 expression and function in early hematopoiesis and leukemic cells. *Immunogenetics*. 2011. 63(6): 337–350
164. Yokoyama H, Harigae H, Takahashi S, Kameoka J, Miyamura K, Ishizawa K, Kaku M, Sasaki T: High expression of YB-1 gene in erythroid cells in patients with refractory anemia. *Int J Hematol*. 2003. 78(3): 213–218
165. Liu S, Marneth AE, Alexe G, Walker SR, Gandler HI, Ye DQ, Labella K, Mathur R, Toniolo PA, Tillgren M, Gokhale PC, Barbie D, Mullally A, Stegmaier K, Frank DA: The kinases IKBKE and TBK1 regulate MYC-dependent survival pathways through YB-1 in AML and are targets for therapy. *Blood Adv*. 2018. 2(23): 3428–3442
166. Herzog C, Polanetzki A, Frey S, Schnoeder TM, Wolleschak D, Mashamba N, Thangapandi VR, Jentsch-Ullrich K, Kahl C, Schroeder N, Mertens PR, Fischer T, Heidel FH: Inflammation Induced Expression of Ybx1 Mediates Resistance to JAK-Kinase Inhibitor Therapy in Myeloproliferative Neoplasia. *Blood*. 2014. 124(21): 161
167. Ventana Medical System, Roche Diagnostics GmbH: iVIEW DAB Detection Kit. Packungsbeilage. 2012. verfügbar unter: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/c1448228-6733-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=de>
168. Shojaeian S, Lay NM, Zarnani AH: Detection Systems in Immunohistochemistry. *Immunohistochemistry - The Ageless Biotechnology*. Charles F. Streckfus. IntechOpen. London. 2020. 3-28
169. Abcam: Recombinant Anti-YB1 antibody [EP2708Y] (ab76149) [zitiert 7. Februar 2021].

verfügbar unter: <https://www.abcam.com/yb1-antibody-ep2708y-ab76149.html>

170. Ventana Medical System, Roche Diagnostics GmbH: Endogenous Biotin Blocking Kit, Katalog-Nr. 760-050. Packungsbeilage. 2008. verfügbar unter: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/3b8de1e5-4233-ea11-fe90-005056a71a5d?countryIsoCode=de>
171. Remmele W, Stegner HE: [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987. 8(3): 138–140
172. Justiz Vaillant AA, Gupta N: ITP-Immune Thrombocytopenic Purpura. StatPearls. Treasure Island (FL). 2022 [zitiert 31. Oktober 2022]. verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537240/>
173. Perner F, Schnoeder TM, Xiong Y, Jayavelu AK, Mashamba N, Santamaria NT, Huber N, Todorova K, Hatton C, Perner B, Eifert T, Murphy C, Hartmann M, Hoell JI, Schröder N, Brandt S, Hochhaus A, Mertens PR, Mann M, Armstrong SA, Mandinova A, Heidel FH: YBX1 mediates translation of oncogenic transcripts to control cell competition in AML. *Leukemia*. 2022. 36(2): 426–437
174. Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M, Rose CM, McDonald ER, Kalocsay M, Jané-Valbuena J, Gelfand E, Schweppe DK, Jedrychowski M, Golji J, Porter DA, Rejtar T, Wang YK, Kryukov GV, Stegmeier F, Erickson BK, Garraway LA, Sellers WR, Gygi SP: Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell*. 2020. 180(2): 387-402.e16
175. Jayavelu AK, Schnöder TM, Perner F, Herzog C, Meiler A, Krishnamoorthy G, Huber N, Mohr J, Edelmann-Stephan B, Austin R, Brandt S, Palandri F, Schröder N, Isermann B, Edlich F, Sinha AU, Ungelenk M, Hübner CA, Zeiser R, Rahmig S, Waskow C, Coldham I, Ernst T, Hochhaus A, Jilg S, Jost PJ, Mullally A, Bullinger L, Mertens PR, Lane SW, Mann M, Heidel FH: Splicing factor YBX1 mediates persistence of JAK2-mutated neoplasms. *Nature*. 2020. 588(7836): 157–163
176. Gieseler-Halbach S, Meltendorf S, Pierau M, Weinert S, Heidel FH, Fischer T, Handschuh J, Braun-Dullaeus RC, Schrappe M, Lindquist JA, Mertens PR, Thomas U, Brunner-Weinzierl MC: RSK-mediated nuclear accumulation of the cold-shock Y-box protein-1 controls proliferation of T cells and T-ALL blasts. *Cell Death Differ*. 2017. 24(2): 371–383
177. Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975. 45(3): 321–334
178. Chai J, Wang Q, Qiu Q, Han G, Chen Y, Li W, Zhang H: YBX1 regulates the survival of chronic myeloid leukemia stem cells by modulating m6A-mediated YWHAZ stability. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022
179. Schmitt-Graeff A, Mattern D, Köhler H, Hezel J, Lübbert M: Myelodysplastisches Syndrom (MDS). *Pathologe*. 2000. 21(1): 1–15

180. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH: Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989. 339(6224): 446–451
181. Suwabe N, Takahashi S, Nakano T, Yamamoto M: GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation. *Blood*. 1998. 92(11): 4108–4118
182. Takahashi S, Komeno T, Suwabe N, Yoh K, Nakajima O, Nishimura S, Kuroha T, Nagasawa T, Yamamoto M: Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo. *Blood*. 1998. 92(2): 434–442
183. Feng M, Xie X, Han G, Zhang T, Li Y, Li Y, Yin R, Wang Q, Zhang T, Wang P, Hu J, Cheng Y, Gao Z, Wang J, Chang J, Cui M, Gao K, Chai J, Liu W, Guo C, Li S, Liu L, Zhou F, Chen J, Zhang H: YBX1 is required for maintaining myeloid leukemia cell survival by regulating BCL2 stability in an m6A-dependent manner. *Blood*. 2021. 138(1): 71–85
184. Ogawara Y, Katsumoto T, Uchiumi T, Kohno K, Kitabayashi I: A Critical Role of YB-1 In NPMc-Induced Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2010. 116(21): 3149
185. Gouda MBY, Hassan NM, Kandil EI, Haroun RAH: Pathogenetic Significance of YBX1 Expression in Acute Myeloid Leukemia Relapse. *Curr Res Transl Med*. 2022. 70(3): 103336
186. Dahl E, En-Nia A, Wiesmann F, Krings R, Djudjaj S, Breuer E, Fuchs T, Wild PJ, Hartmann A, Dunn SE, Mertens PR: Nuclear detection of Y-box protein-1 (YB-1) closely associates with progesterone receptor negativity and is a strong adverse survival factor in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2009. 9: 410
187. Wu J, Lee C, Yokom D, Jiang H, Cheang MCU, Yorida E, Turbin D, Berquin IM, Mertens PR, Iftner T, Gilks CB, Dunn SE: Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res*. 2006. 66(9): 4872–4479
188. Woolley AG, Algie M, Samuel W, Harfoot R, Wiles A, Hung NA, Tan PH, Hains P, Valova VA, Huschtscha L, Royds JA, Perez D, Yoon HS, Cohen SB, Robinson PJ, Bay BH, Lasham A, Braithwaite AW: Prognostic Association of YB-1 Expression in Breast Cancers: A Matter of Antibody. *PLoS One*. 2011. 6(6): e20603

6.2. Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

6.3. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Das Y-Box-bindende Protein 1 bei Myeloproliferativen Neoplasien und Myelodysplastischen Syndromen

im Institut für Pathologie unter Leitung von Professor Dr. med. D. Jechorek

mit Unterstützung durch PD Dr. med. Nicolas Schröder, Dipl.-Math. Anke Lux und den Mitarbeiterinnen des immunhistochemischen Labors

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 09.02.2023

Kristin Beate Krausewitz

6.4. Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.