

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser)

**Molekulare Charakterisierung und Diagnostik ausgewählter
hämatologischer und solider maligner Neoplasien**

Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
eines habilitierten Doktors der Medizin (Dr. med. habil.)
für das Fachgebiet Pathologie

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Dr. nat. med. Dipl. Biol. Udo Siebolts
geboren am 15.01.1972 in Aurich

Eröffnung des Habilitationsverfahrens am 25.09.2018

Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. A. Hartmann, Direktor des Instituts für Pathologie,
Universitätsklinikum Erlangen

Univ.-Prof. Dr. med. W. Weichert, Direktor des Instituts für Pathologie,
Universitätsklinikum, Technische Universität München

Vorlesung am 04.04.2019

Verteidigung am 21.05.2019

Referat

Die Behandlung fortgeschrittener maligner Neoplasien mit den klassischen, wenig selektiven Therapien der chirurgischen, chemotherapeutischen und strahlentherapeutischen Ansätze erfährt in den letzten Jahren einen rasanten Wandel hin zu einer personalisierten Medizin. Die Voraussetzung für die zunehmende Individualisierung der Krebstherapie sind detaillierte Kenntnisse über die Genese der einzelnen Erkrankungen, die biologischen Charakteristika des Untersuchungsgutes und die einzusetzenden molekularen Methoden.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Charakterisierung von myeloproliferativen Neoplasien konnten wir neben der erstmaligen Darstellung der Verteilung von neoplastischen Zellen im Blut zeigen, dass diese Progenitorzellen von Patienten mit Polyzythämia vera eine Dysregulation von Wachstumsrezeptoren sowie eine Unausgewogenheit der verschiedenen Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase aufweisen. Diese Charakteristika könnten ursächlich zu verschiedenen bekannten Veränderungen im Rahmen der Erkrankung beitragen, wie die verlängerte Lebensdauer, erhöhte Proliferation dieser Zellen und die Akkumulation von chromosomalen Schäden.

Für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie mit Zustand nach allogener Stammzelltransplantation konnten wir im Vergleich zu Patienten mit primärer Myelofibrose darstellen, dass, trotz vollständiger Spenderhämatopoiese im Blut, eine deutlich höhere Anzahl an neoplastischen Progenitorzellen im Knochenmark mit der schlechteren Prognose dieser Patientengruppe korreliert.

Das neu entdeckte Gebiet der nicht kodierenden RNA eröffnet neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie auch der myeloproliferativen Neoplasien. Wir konnten zeigen, dass die Möglichkeit besteht, aus archiviertem, formalinfixierten, teils dekalzifizierten und paraffinierten Material auch nach Jahren ausreichend Material für vergleichende Expressionsanalysen zu gewinnen.

Zum therapiebegleitenden Monitoring von Patienten mit *JAK2* positiven myeloproliferativen Neoplasien entwickelten wir ein Verfahren mit einer bis dahin nicht erreichten technischen Sensitivität von 0,001 % und konnten damit sowohl die Prognose der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation bestimmen als auch Rezidive schon Monate vor den klinischen Symptomen vorhersagen.

Siebolts, Udo: Molekulare Charakterisierung und Diagnostik ausgewählter hämatologischer und solider maligner Neoplasien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Habil., 119 Seiten, 1 Tab., 3 Abb., 2018

I Inhaltsverzeichnis

Referat.....	2
I Inhaltsverzeichnis.....	3
II Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	5
1. Einleitung	8
1.1 Myeloproliferative Neoplasien	8
1.1.1 Chronische myeloische Leukämie, <i>BCR-ABL1</i> – positiv.....	10
1.1.2 <i>BCR-ABL1</i> negative klassische myeloproliferative Neoplasien	11
1.2 Molekulare Pathophysiologie <i>BCR-ABL1</i> negativer klassischer myeloproliferativer Neoplasien	13
1.3 Molekulare Diagnostik myeloproliferativer Neoplasien	16
1.3.1 Molekulare Diagnostik der chronischen myeloischen Leukämie	17
1.3.2 Molekulare Diagnostik der <i>BCR/ABL</i> negativen klassischen myeloproliferativen Neoplasien	19
1.4 Klonalität als Prinzip der malignen Neoplasie	22
1.5 Sensitivität molekularpathologischer Testverfahren	24
1.6 Nachweis von tumorassozierten Mutationen im Blut (Liquid Biopsy)	25
1.6.1 Historie und Definition.....	25
1.6.2 Analyten im Rahmen der Liquid Biopsy Diagnostik	28
1.6.3 Mechanismen der Freisetzung in das periphere Blut	29
1.6.4 Anwendungsmöglichkeiten der Liquid Biopsy	31
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikationen	36
2.1 Molekulare Charakterisierung maligner Neoplasien.....	36
2.1.1 Molekulare Charakterisierung myeloproliferativer Neoplasien	36
2.1.2 Weitere Studien zur molekularen Charakterisierung maligner Neoplasien	39
2.1.3 Vergleichender Nachweis tumorassoziierter Mutationen zur Tumorcharakterisierung	41
2.1.4 Vergleichende Klonalitätsanalyse zur differentialdiagnostischen Charakterisierung lymphoproliferativer Neoplasien	44
2.2 Entwicklung spezialisierter molekularpathologischer Verfahren.....	46
2.2.1 MicroRNA als möglicher Analyt in der molekularpathologischen Diagnostik	46

2.2.2	Hochsensitives Verfahren zum Nachweis der <i>JAK2</i> p.V617F Punktmutation zur molekularen Diagnostik und zum Monitoring an peripherem Blut.....	47
2.2.3	Hochsensitives Verfahren zum diagnostischen Nachweis von Treibermutationen an Feinnadelaspiraten von Schilddrüsenknoten.....	51
2.3	Eigene Publikationen im Rahmen der Habilitationsschrift in Reihenfolge der Erwähnung in Kapitel 2.....	52
3.	Literaturverzeichnis.....	56
4.	Thesen.....	70
5.	Publikationen.....	72
III	Selbstständigkeitserklärung.....	116
IV	Erklärung über frühere Habilitationsversuche.....	117
VI	Lebenslauf.....	118

II Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Eigennamen von Genen werden nicht aufgeführt

AML	akute myeloische Leukämie
ARMS	<i>amplification refraction mutation system</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BPDCN	<i>blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm</i>
CCR	<i>complete cytogenetic response</i>
CHIP	<i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleid acid</i>
CEL	chronische Eosinophilenleukämie
cfDNA	<i>cell free desoxyribonucleid acid</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CMPD	<i>chronic myeloproliferative disease</i>
CMPE	chronische myeloproliferative Erkrankung
CNL	chronische Neutrophilenleukämie
CTC	<i>circulating tumor cell</i>
ctDNA	<i>circulating tumor desoxyribonucleid acid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dPCR	<i>digital polymerase chain reaction</i>
ET	essentielle Thrombozythämie
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FFPE	<i>formalin fixed paraffin embedded</i>

FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FNA	Feinnadelaspiration
FTC	<i>follicular thyroid cancer</i>
HES	hypereosinophiles Syndrom
IS	<i>international scale</i>
ISH	in situ Hybridisierung
kD	kilo Dalton
LBx	<i>liquid biopsy diagnostics</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MDS	myelodysplastisches Syndrom
miRNA	<i>micro ribonucleid acid</i>
MMR	<i>major molecular response</i>
MPN	myeloproliferative Neoplasie
MRD	<i>minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i> (Parallelsequenzierung)
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Ph	Philadelphiachromosom
PMF	primäre Myelofibrose
PSA	prostataspezifisches Antigen
PubMed	US National Library of Medicine

PV	Polyzythämia vera
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s-BOT	seröser Borderlinetumor
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
TEP	<i>tumor educated platelets</i>
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMB	<i>tumor mutational burden</i>
UICC	<i>union internationale contre le cancer (franz.)</i>
WES	<i>whole exome sequencing</i>
WHO	<i>world health organisation</i>

1. Einleitung

Grundvoraussetzung für die molekulare Diagnostik maligner Neoplasien ist die Kenntnis (1) über die kausale und formale Genese jeder einzelnen Erkrankung, (2) über die biologischen Charakteristika des Untersuchungsgutes, seien es Tumorresektate, Tumorbiopsien oder dispergierte Tumorprodukte in Körperflüssigkeiten und (3) über die verwendeten molekularbiologischen Methoden.

Die dieser kumulativen Habilitationsschrift zu Grunde liegenden Publikationen beleuchten jeweils Teilaspekte dieser komplexen Fragestellungen für ausgewählte maligne Neoplasien, Analyte und/oder Techniken. Die folgenden Kapitel geben eine Übersicht über die aktuellen Erkenntnisse der behandelten Themengebiete.

1.1 Myeloproliferative Neoplasien

William Dameshek beschrieb 1951 als erster das bahnbrechende Konzept der myeloproliferativen Erkrankungen mit den klassischen Entitäten der chronischen myeloischen Leukämie (CML), der Polycythämia vera (PV), der essentiellen Thrombozythämie (ET) und der primären Myelofibrose (PMF) (Dameshek, 1951).

In der 2001 erschienenen 3. Auflage der WHO Klassifikation von Tumoren des hämatopoietischen und lymphatischen Gewebes wurde der Begriff der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (chronic myeloproliferative diseases, CMPE) eingeführt (Jaffe et al., 2001; Vardiman and Harris, 2001). In dieser Gruppe wurden zusätzlich die chronische Neutrophilenleukämie (CNL), die chronische Eosinophilenleukämie (CEL) (auch hypereosinophiles Syndrom, HES) sowie die CMPD, unklassifizierbar, ergänzt.

Eine erneute Änderung der Einordnung einzelner Erkrankungen sowie deren Namensgebung vollzog die 2008 erschienene 4. Auflage der WHO

Klassifikation. Da der klonale und damit neoplastische Ursprung mittlerweile akzeptiert war, wurde der Name „myeloproliferative Neoplasien (MPN)“ gewählt, der noch heute Gültigkeit hat (Swerdlow et al., 2008; Tefferi and Vardiman, 2008; Vardiman et al., 2009). Die Gruppe der Mastzellerkrankungen wurde nun ebenfalls unter dem Oberbegriff MPN geführt. Die seltene Form der Philadelphia-chromosom (Ph) negativen CML wurde als atypische chronische myeloische Leukämie, *BCR-ABL1* negativ, unter der Gruppe der myelodysplastischen / myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) als eigenständige und von den klassischen MPN getrennte Erkrankung eingeordnet.

Bedingt durch den zunehmenden Informationsgewinn durch molekularbiologische Forschung wurde in der WHO Klassifikation von 2008 zum ersten Mal eine Klassifikation anhand genetischer Eigenschaften durch die Schaffung der Gruppe der Myeloischen Neoplasien assoziiert mit Eosinophilie und Abnormalitäten von *PDGFRA*, *PDGFRB* oder *FGFR1* vorgenommen.

In der aktuell gültigen WHO-Klassifikation von 2017, die eine Revision der 4. Auflage darstellt, werden die Mastzellerkrankungen oder auch Mastozytosen nunmehr als eigene Gruppe geführt. Die MPN unterteilen sich nun in die klassischen Erkrankungen *BCR-ABL1* positive CML, ET, PV, PMF sowie die chronische Neutrophilenleukämie, die chronische Eosinophilenleukämie, nicht anders spezifiziert, sowie die MPN, unklassifizierbar (Tabelle 1) (Swerdlow et al., 2017).

Tabelle 1. 2017 WHO Klassifikation für myeloproliferative Neoplasien
- Acute myeloid leukaemia
- Myelodysplastic syndromes (MDS)
- Myeloproliferative neoplasms (MPN)
- Chronic myeloid leukaemia, <i>BCR-ABL1</i> -positive
- Polycythemia vera
- Essential thrombocythaemia
- Primary myelofibrosis
- Prefibrotic/early primary myelofibrosis
- Overt primary myelofibrosis
- Chronic neutrophilic leukaemia

- Chronic eosinophilic leukaemia, not otherwise specified
- Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable
- MDS/MPN
 - Chronic myelomonocytic leukaemia
 - Atypical chronic myeloid leukaemia, *BCR-ABL1*-negative
 - Juvenile myelomonocytic leukaemia
 - MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis
 - MDS/MPN, unclassifiable
- Myeloid neoplasms associated with eosinophilia and gene rearrangement
 - Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRA rearrangement
 - Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRB rearrangement
 - Myeloid/lymphoid neoplasms with FGFR1 rearrangement
 - Myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2

1.1.1 Chronische myeloische Leukämie, *BCR-ABL1* – positiv

Die *BCR-ABL1* positive CML ist dominiert von einer überschießenden neoplastischen Proliferation einer ausreifenden Granulopoese und ist mit einer Inzidenz von 1,6 auf 100.000 Einwohner die häufigste Erkrankung aus der Gruppe der chronischen myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Sie ist die erste Erkrankung, bei der ein einzelner chromosomaler Defekt als ätiopathologisch bereits im Jahr 1960 in Philadelphia beschrieben werden konnte (Geary, 2000; Nowell and Hungerford, 1960). Erst 20 Jahre später konnte die als Philadelphia Chromosom bekannt gewordene Aberration als reziproke Translokation von Anteilen der Chromosomen 9 und 22 dargestellt werden (de Klein et al., 1982). Dabei kommt es zu einer Verlagerung des sogenannten Abelson Onkogens (*ABL*) von Chromosom 9 in eine umschriebene Region des Chromosoms 22, die sogenannte „breakpoint cluster region“ oder BCR. Das *BCR* Gen kodiert für ein 160 kD großes Phosphoprotein mit assoziierter Serin/Threonin-Kinaseaktivität. Verschiedene Bruchpunkte im *BCR* Gen im Rahmen der Translokation sind bekannt, wohingegen nur ein Bruchpunkt im *ABL* Gen auftritt (Groffen et al., 1984; Hermans et al., 1987; Shtivelman et al., 1985). Die Lage der entsprechenden Bruchpunkte ergibt das für die individuelle Neoplasie bestimmende Fusionsgen. Die onkogenen Produkte der häufigsten Fusionen sind p210(*BCR-ABL*) und p185(*BCR-ABL*). Allen Produkten gemeinsam ist die

konstitutive Aktivierung und somit onkogene Wirkung der nun ungehemmten Tyrosinkinasedomäne des Abelson Onkoproteins (ABL) (Maru and Witte, 1991).

Die Therapie der CML basierte zunächst insbesondere auf der allogenen Knochenmarktransplantation und somit war die Detektion eines frühen Rezidivs von größter Bedeutung für die weitere Therapieplanung der Patienten. Ein vielversprechender Ansatz war die molekulare Detektion der definierten genetischen Aberration auf RNA Ebene. So konnte mittels der revers transkribierenden Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) eine sogenannte minimale Resterkrankung („minimal residual disease“, MRD) sensitiv erkannt werden und als Prädiktor für zukünftige Rezidive eingesetzt werden (Hughes et al., 1991; Lion et al., 1993; Radich et al., 1995). Mit Einführung der gezielten Tyrosinkinaseinhibitortherapie wurde die Transplantation zügig in den Hintergrund gedrängt und die 10-Jahres-Überlebensrate stieg bis auf aktuell 80 bis 90% (Castagnetti et al., 2015). Die Detektion der minimalen Resterkrankung mittels RT-PCR an peripherem Blut wird trotz der geänderten Therapiestrategie weiterhin mit großem Erfolg eingesetzt und kann die Patienten definieren, die keiner weiteren Therapie bedürfen (Egan and Radich, 2016; Radich, 2009).

1.1.2 *BCR-ABL1* negative klassische myeloproliferative Neoplasien

Die Polyzythämia vera (PV), die essentielle Thrombozythämie und die primäre Myelofibrose (PMF) werden als klassische Philadelphia Chromosom (Ph) negative myeloproliferative Neoplasien bezeichnet (Swerdlow et al., 2017). Es handelt sich um klonale hämatopoietische Stammzellerkrankungen, welche im Wesentlichen durch ein hyperproliferatives hämatopoietisches Knochenmark mit einer Vermehrung funktioneller Blutzellen charakterisiert sind. Diese neoplastische Blutzellpopulation kann entweder eine oder auch mehrere myeloische Zellreihen (Granulopoiese, Erythropoiese, Megakaryopoiese) betreffen.

Betroffen sind vor allem ältere Patienten mit einem Gipfel der Altersverteilung in der fünften bis siebten Lebensdekade, es sind aber auch Erkrankungen bei jungen Erwachsenen und Kindern beschrieben. Insgesamt beträgt die jährliche

Inzidenz der drei Erkrankungen sechs pro 100.000 Einwohner (Swerdlow et al., 2008, 2017).

In der Erforschung dieser Erkrankungen kam es 2005 zu einem Durchbruch in der Charakterisierung molekularer Veränderungen, als fünf unabhängige Arbeitsgruppen zeitgleich eine konstitutiv aktivierende Punktmutation im *JAK2* Gen p.V617F publizierten (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005; Zhao et al., 2005). Die Janus Kinase 2 (*JAK2*), eine Tyrosinkinase im *JAK-STAT*-Signaltransduktionsweg, welcher unter anderem durch Rezeptortyrosinkinasen wie den Erythropoietinrezeptor oder Interleukinrezeptoren aktiviert wird, reguliert eine Reihe an zellulären Prozessen wie die Steuerung der Erythropoese und Thrombopoese. Des Weiteren können auch der MAPKinase- und der PI3Kinase- Signalweg und somit die Kontrolle über Proliferation und Apoptose durch *JAK2* beeinflusst werden. Kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung durch eine entsprechende Mutation, so kann diese als Treibermutation angesehen werden (James et al., 2005; Shammo and Stein, 2016; Staerk et al., 2007).

Nahezu alle Patienten mit PV und etwa die Hälfte der Patienten mit ET und PMF zeigen eine *JAK2* p.V617F Mutation. Von den wenigen p.V617F negativen PV Patienten wiederum zeigen einige eine aktivierende komplexe Mutation im Exon 12 des *JAK2* Gen. Weitere aktivierende Punktmutationen im Thrombopoietinrezeptorgen (*MPL* p.W515L/K/A/R/G oder p.S505N) und Frameshiftmutationen im Exon 9 des Calreticulingens (*CALR*, Insertion / Deletion) können in einem Teil der *JAK2* negativen ET und PMF Patienten nachgewiesen werden (Defour et al., 2016; Klampfl et al., 2013; Passamonti et al., 2016; Pikman et al., 2006; Scott et al., 2007). Ca. 2 % der Patienten mit PV und jeweils ca. 12 % der Patienten mit ET und PMF zeigen keine der bekannten Treibermutationen (Swerdlow et al., 2017).

Seit 2008 sind diese molekularen Merkmale Teil der diagnostischen Kriterien, da diese Mutationen nicht bei reaktiven Läsionen zu finden sind (Tefferi, 2007). Bei den myeloischen Neoplasien jedoch gibt es in seltenen Fällen Überschneidungen zu anderen Entitäten. So kann z.B. die *JAK2* p.V617F Mutation im Rahmen des myelodysplastischen Syndroms mit Ringsideroblasten

mit assoziierter Thrombozytose (früher RARS-T) (Ceesay et al., 2006; Szpurka et al., 2006) sowie in geringerer Häufigkeit bei anderen myeloischen Neoplasien auftreten (Jelinek et al., 2005; Kremer et al., 2006; Lee et al., 2006; Nishii et al., 2007; Zecca et al., 2007), jedoch nicht in lymphatischen Neoplasien (Fiorini et al., 2006; Melzner et al., 2006). Somit ist die molekulare Charakterisierung alleine nicht in der Lage, die verschiedenen MPN Entitäten zu unterscheiden, kann jedoch die Histologie insbesondere in der Differentialdiagnose zu reaktiven Thrombozytosen oder Myelofibrosen unterstützen. Dies schlägt sich auch seit 2008 in der jeweils gültigen WHO- Klassifikation nieder, in der die Mutationen ebenso wie auch die Histologie an der Knochenmarkstanzbiopsie als sog. Major Kriterien in der Diagnostik für PV, ET und PMF geführt werden (Swerdlow et al., 2008, 2017). Darüber hinaus kann die molekulare Charakterisierung zusätzliche Informationen zur individuellen Prognose der Patienten liefern (Alvarez-Larrán et al., 2017; Rotunno et al., 2014; Rumi et al., 2014; Tefferi and Vannucchi, 2017; Tefferi et al., 2014, 2017).

1.2 Molekulare Pathophysiologie *BCR-ABL1* negativer klassischer myeloproliferativer Neoplasien

Die oben dargestellten Mutationen im *JAK2*, *MPN* und *CALR* Gen sind biologisch als sogenannte Treibermutationen einzuordnen (Alvarez-Larrán et al., 2017; Tefferi and Vannucchi, 2017). Das bedeutet, dass durch die konstitutiv aktivierten Proteine die entsprechenden intrazellulären Signalwege unabhängig von der Stimulation durch spezifische Wachstumsfaktoren ein neoplastisches Wachstum bedingen (Cazzola and Skoda, 2005; Vannucchi and Guglielmelli, 2008). Alle diese Mutationen haben direkten Einfluss sowohl auf die Hämatopoiese als auch auf die Steuerung der Proliferation und des Zellzyklus (James et al., 2005; Shammo and Stein, 2016; Staerk et al., 2007). Die onkogene Wirkung wird bei der *JAK2* Mutation über eine konstitutive Aktivierung des *JAK/STAT* Signaltransduktionswegs, im Fall der *MPL* Mutation direkt über die Aktivierung des Thrombopoietinrezeptors und bei den *CALR* Mutationen indirekt über die Aktivierung des Thrombopoietinrezeptors erreicht (Vainchenker and Kralovics, 2017).

Interessanterweise kann die *JAK2* p.V617F Mutation in Ausnahmefällen auch in gesunden Patienten nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wird vermehrt das Konzept der klonalen Hämatopoiese mit unbestimmtem Potential („clonal hematopoiesis of indeterminate potential“ CHIP) diskutiert. Die CHIP beschreibt das Phänomen, dass mit zunehmendem Lebensalter die Wahrscheinlichkeit steigt, eine klonale Hämatopoiese mit Nachweis von potentiellen Treibermutationen im peripheren Blut zu entwickeln (u.a. *JAK2*, *TP53*, *DNMT3*). Bis zu 15 % der über 70 Jährigen und mehr als 30 % der über 85 Jährigen zeigen demnach eine klonale Hämatopoiese. In einigen Fällen konnte eine Progression in myeloproliferative Neoplasien bis hin zu Leukämien beobachtet werden. Heute geht man davon aus, dass das Risiko zur Entwicklung einer hämatologischen Neoplasie bei Nachweis einer CHIP bei 0,5 bis 1 % liegt. (Gibson and Steensma, 2018; Hinds et al., 2016; McKerrell et al., 2015; Steensma, 2018).

Dies legt nahe, dass die beschriebenen Mutationen bei PV, ET und PMF nicht im Sinne einer monokausalen Ätiopathogenese gesehen werden können. Vielmehr scheinen weitere individuelle Faktoren Einfluss auf die Ausprägung der verschiedenen Erkrankungen zu nehmen. So kann im Falle der *JAK2* p.V617F Mutation ein Verlust der Heterozygotie („Loss of Heterozygoty“, LOH) durch eine mitotische Rekombination auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 in ca. 30 % der PV und PMF Patienten festgestellt werden, im Gegensatz zu lediglich 2 bis 4 % der ET Patienten. Dabei gilt, dass die Homozygotie für *JAK2* p.V617F eine erhöhte Sensitivität gegenüber Erythropoietin bedingt und eine erhöhte Aktivität des *JAK2* / *STAT* Signalweges gemessen werden kann. Eine Erklärung hierfür kann eine fehlende Konkurrenz zwischen dem normalen und dem mutierten Allel oder auch eine erhöhte Interaktion mit Regulatoren wie dem suppressor of cytokine signaling-3 (*SOCS-3*) sein (Hookham et al., 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Ratio zwischen exprimierter normaler und mutierter *JAK2* mRNA die phänotypische Ausprägung der Erkrankung widerspiegelt (Tiedt et al., 2008).

Auch für die *MPL* und die *CALR* Mutationen konnte in retroviralen Mausmodellen gezeigt werden, dass sich Phänotypen vergleichbar zur ET und

PMF in den Tieren entwickeln (Balligand et al., 2016; Elf et al., 2016; Marty et al., 2016; Pikman et al., 2006).

Die klassischen Ph negativen MPN zeigen neben den Treibermutationen weitere genomische Veränderungen, die in Kombination die phänotypische Ausprägung der individuellen Erkrankungen erklären könnten. Insbesondere durch die neue Generation an Sequenzierverfahren („Next Generation Sequencing“, NGS oder Parallelesequenzierung) konnten weitere Mutationen beschrieben werden in Regulatoren der DNA- Methylierung (z.B. *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), Histonmodifikatoren (*Polycomb* repressor complex 1 und 2 members, *EZH2*, *ASXL1*), Transkriptionsfaktoren (*TP53*, *CUX1*, *IKZF1*, *FOXP1*, *ETV6*, *RUNX1*), weiteren Proteinen der Signalwege (*NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *LNK*, *CBL*, *FLT3*) und RNA Splice Faktoren (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) (Pasquier et al., 2014; Rampal et al., 2014; Stegelmann et al., 2010; Vainchenker and Kralovics, 2017). Dabei zeigt sich die höchste Anzahl zusätzlicher Mutationen bei Patienten mit *JAK2* p.V617F positiver PMF, wohingegen Patienten mit ET mit *CALR* Mutation die geringste Anzahl zusätzlicher Mutationen aufweisen. Das Auftreten von weiteren Mutationen, welche auch in anderen myeloischen Neoplasien vorkommen können, ist offenbar verknüpft mit zunehmenden phänotypischen Veränderungen im Sinne eines Progresses hin zu MPN/MDS und MDS mit zunehmender Schwere der Erkrankungen (Vainchenker and Kralovics, 2017).

Mutationen wie *TET2* und *DNMT3* können nicht nur sekundär zur Treibermutation *JAK2* p.V617F auftreten sondern können auch bereits vor Entstehung der klassischen Treibermutation bei symptomatischen Patienten vorhanden sein (Delhommeau et al., 2009; Stegelmann et al., 2011). Dieses Phänomen und die Erkenntnisse zur CHIP legen nahe, dass bei Entstehung der Neoplasie eine evolutionäre Selektion hin zu einem durchsetzungsfähigen neoplastischen Klon oft mit Ausbildung einer klassischen Treibermutation auftritt. Interessant hierbei ist, dass je nachdem, ob die *TET2* Mutation vor oder nach Auftreten der *JAK2* p.V617F oder *CALR* Mutation geschieht, dies den Phänotyp der Erkrankung mitbestimmt. So ist beschrieben worden, dass die *TET2* Mutation vor der p.V617F Mutation eher einen ET Phänotyp bestimmt

und das spätere Auftreten eher einen PV Phänotyp nach sich zieht (Lundberg et al., 2014).

Eine „Loss of Function“ Mutation im *EZH2* Gen findet sich in 5 bis 10 % der Patienten mit PMF und ist häufig assoziiert mit einer synchronen *JAK2* p.V617F Mutation. Diese Kombination bedingt eher eine schlechte Prognose im Sinne einer fortschreitenden Myelofibrose (Guglielmelli et al., 2011; Yang et al., 2016).

Ebenfalls mit charakteristischen Ausprägungen und damit einhergehend einer schlechten Prognose sind Mutationen in den Genen *ASXL1* und *SRSF2* assoziiert. Ca. 25 % der PMF Patienten tragen eine Mutation in dem epigenetischen Regulator *ASXL1* und bieten ein erhöhtes Risiko einer Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML). Ähnliches ist für Patienten mit Mutation im Splicingfaktor *SRSF2* beschrieben (Vainchenker and Kralovics, 2017).

Zusammengenommen erscheint die molekulare Ätiopathogenese der klassischen Ph negativen MPN hochkomplex. Neuere Daten zeigen ein kompliziertes Zusammenspiel der klassischen Treibermutationen (*JAK2*, *MPL*, *CALR*) mit zahlreichen weiteren Mutationen, welche teils initial vor Auftreten der Treibermutation, teils sekundär in den individuellen Neoplasien nachgewiesen werden können. Dabei werden der Phänotyp und auch die Prognose für den Patienten mitbestimmt, wobei bislang nur ansatzweise geklärt ist, wie diese verschiedenen Faktoren interagieren.

1.3 Molekulare Diagnostik myeloproliferativer Neoplasien

Die Entwicklung der molekularen Diagnostik myeloproliferativer Neoplasien ist naturgemäß eng verknüpft mit der technischen Entwicklung molekularbiologischer Methoden. Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, ist erst nach Anwendung neuer Verfahren mit der Möglichkeit der Sequenzierung einer großen Anzahl von Genen oder sogar der Sequenzierung des gesamten Exoms („whole exome sequencing“, WES) die tatsächliche Komplexität im Zusammenspiel der molekularen Ätiopathogenese aufgedeckt worden. Diese Informationen können zur primären Diagnostik mit Festlegung

der Entität, zur Darstellung einer minimalen Resterkrankung unter Therapie, zur individuellen Prognosebestimmung und, bei entsprechenden Therapeutika, auch zur prädiktiven Diagnostik genutzt werden.

Durch die Einführung der personalisierten Medizin mit medikamentöser Therapie durch sogenannte Biologica konnten für zahlreiche hämatologische und auch solide Neoplasien teils bahnbrechende Therapieerfolge erzielt werden. Dabei kommen entweder sogenannte „small molecules“ im Sinne von Kinaseinhibitoren intrazellulär zum Einsatz oder es werden entsprechende Oberflächenantigene, oft Rezeptoren, durch einen monoklonalen Antikörper blockiert. Durch die gezielte Wirkweise wird der Tumorprogress gestoppt oder sogar rückgängig gemacht und damit eine Remission der Erkrankung bei im Vergleich zu anderen Therapien deutlich weniger Nebenwirkungen erreicht (Ross et al., 2004). Dabei kann eine neoplastische Erkrankung mit schlechter Prognose in eine chronisch verlaufende Krankheit überführt werden, wie die Zahlen zur 5-Jahres-Überlebensrate z.B. des Robert Koch-Instituts für viele Tumorerkrankungen zeigen (Kaatsch et al., 2015).

1.3.1 Molekulare Diagnostik der chronischen myeloischen Leukämie

Für die *BCR-ABL1* positive chronische myeloische Leukämie (CML Ph+) beruht die Diagnostik bei 100 % Penetranz auf dem Nachweis der definierenden Translokation *BCR/ABL1*. Hier hat die Entwicklung molekularbiologischer Techniken von der Zytogenetik über die in situ Hybridisierungen (ISH), Southern oder Western Blot Analysen über die RT-PCR zur Parallelsequenzierung geführt. Welche Verfahren im Einzelfall gewählt werden, richtet sich insbesondere nach den etablierten Verfahren in den diagnostischen Laboratorien und nach dem angestrebten Umfang der gewünschten Informationen.

Mit Einführung von Imatinib als erstem Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) 1998 geschah ein radikaler Umbau in der Therapie der CML mit der Notwendigkeit der Darstellung des Therapieerfolgs durch molekularen Nachweis einer möglichen minimalen Resterkrankung (Hughes and Branford, 2009).

Mittlerweile sind weitere Wirkstoffe wie z.B. Dasatinib und Nilotinib zur Therapie der CML zugelassen und bieten dem Hämatonkologen die Möglichkeit, je nach individuellem Krankheitsverlauf die Therapie anzupassen. Dabei spricht man im Allgemeinen bei Imatinib von der 1. Generation, bei Dasatinib, Nilotinib und Bosutinib auf Grund der besseren Bindungseigenschaften von der 2. Generation und bei Wirkstoffen wie Ponatinib mit zusätzlicher Wirkung gegen Resistenzmutationen (T315I) inzwischen von Medikamenten der 3. Generation (Schmitt and Brümmendorf, 2016).

Die spezifischen TKI in der CML Therapie wirken über eine kompetitive Inhibierung der Adenosintriphosphat (ATP) Bindungsstelle der Tyrosinkinase und verhindern somit die aktivierende Autophosphorylierung und Signalweitergabe. Dadurch wird die neoplastische Zelle effektiv an der weiteren Proliferation gehindert und teils eine Apoptose eingeleitet. Trotz der großen Erfolge in der Therapie zeigen sich in vielen Fällen Resistenzen mit anschließender Rezidivbildung trotz laufender Therapie. Dabei lassen sich bei diesen Patienten sogenannte Resistenzmutationen vor allem in der ABL-Kinasedomäne nachweisen. Unter Therapie kommt es offensichtlich im Rahmen der Grunderkrankung zu zufälligen Punktmutationen, welche im Einzelfall die Potenz der Resistenzentwicklung haben. Der entsprechende Tumorzellklon erhält dadurch einen Selektionsvorteil und die Therapie verliert ihre Wirkung (Branford, 2007; Patel et al., 2017; Radich and Mauro, 2017). Im Sinne einer sequentiellen Therapie besteht dann die Möglichkeit, auf andere TKI- Wirkstoffe auszuweichen, da diese unterschiedliche Bindungseigenschaften an das Zielprotein haben. In vielen Fällen kann somit die Behandlung des Patienten erfolgreich fortgeführt werden. So kann Nilotinib die ABL- Kinase mit einer 20 bis 50fach höheren Potenz als Imatinib binden und damit inhibieren (Schmitt and Brümmendorf, 2016). Dasatinib wurde ebenfalls schon 2006 von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zur Therapie der CML auf Grund der verbesserten Bindungseigenschaften zugelassen (Lombardo et al., 2004; Talpaz et al., 2006). In wenigen Fällen finden sich Resistenzmutationen schon bei der initialen Diagnosestellung. Bei Nachweis der p.T315I Mutation wurde hier der TKI Ponatinib als Erstlinientherapeutikum zugelassen (Kujak and Kolesar, 2016; Schmitt and Brümmendorf, 2016).

Eine quantitative molekulare Diagnostik mit Nachweis der *BCR/ABL1* Translokation wird für die Patienten unter TKI- Therapie empfohlen. Dabei richten sich die empfohlenen Intervalle der Tests insbesondere nach dem klinischen Bild der individuellen Erkrankung. Falls notwendig, muss der Patient engmaschig kontrolliert werden, um ein Anstieg der Allellast frühzeitig zu bemerken und gegebenenfalls auf eine medikamentöse Zweitlinientherapie oder in seltenen Fällen auch auf eine Stammzelltransplantation zu wechseln (Baccarani et al., 2008; Hughes and Branford, 2009; Kantarjian et al., 2008; Schmitt and Brümmendorf, 2016).

Der Nachweis der Allellast des Philadelphiachromosoms (Ph) spielt, wie oben dargestellt, eine entscheidende Rolle in der Therapieplanung des CML Patienten. Als akzeptierter Goldstandard gilt dabei nach wie vor der Nachweis auf mRNA- Ebene mittels der revers transkribierenden quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR). Um die Werte international und zwischen einzelnen Laboratorien vergleichen zu können, wurde bereits 2006 ein vergleichender Koeffizient für die geprüften Labore eingeführt (Alikian et al., 2017; Branford et al., 2006). Dieser *international scale* (IS) erlaubt den direkten Vergleich der Werte aus verschiedenen Laboratorien und erfüllt damit gleichzeitig den Zweck der Qualitätskontrolle. Dabei ist für den Onkologen wichtig zu wissen, ob bestimmte Schwellenwerte für die Allellast erreicht sind ($\leq 0,1\%$ = major molecular response (MMR); 1% äquivalent zu complete cytogenetic response (CCR)) (Cortes et al., 2011). In den kommenden Jahren ist zu erwarten, dass neuere molekulare Techniken wie NGS und digitale PCR (dPCR) zunehmend die klassische RT-qPCR auf Grund höherer Sensitivität, Robustheit und der erzielten genetischen Zusatzinformationen ablösen werden (Schmitt and Brümmendorf, 2016).

1.3.2 Molekulare Diagnostik der *BCR/ABL* negativen klassischen myeloproliferativen Neoplasien

Die Therapie der ET, PV und PMF ist insbesondere bestimmt durch die Klinik der Patienten. In initialen Stadien mit geringem Risikoprofil kommen klassische

Therapien wie der Aderlass, Acetylsalicylsäure, Hydroxyurea oder Interferon alpha zum Einsatz. Bei Patienten mit zunehmender Myelofibrose bei PMF oder post-PV Myelofibrose kann eine Stammzelltherapie bei allerdings hohem therapieassoziierten Risiko in Betracht gezogen werden. Alternativ kann Ruxolitinib, ein JAK1 / JAK2 Tyrosinkinaseinhibitor, in prognostisch ungünstigen Stadien gegeben werden. Im Vergleich zur CML ist die Auswahl an Kinaseinhibitoren auf Ruxolitinib beschränkt. Zahlreiche weitere JAK Inhibitoren wurden in klinischen Studien untersucht, kamen jedoch auf Grund mangelnder Therapieerfolge oder schwerer Nebenwirkungen nicht zur Zulassung (Vannucchi and Harrison, 2017).

Die molekulare Diagnostik im Rahmen der klassischen Ph negativen MPN ist auf Grund der im Vergleich zur CML erst späten Entdeckung der *JAK2* p.V617F Treibermutation im Jahr 2005 eine junge Methodik. Wie schon beschrieben, sind nicht alle Patienten positiv, es gibt mehrere Mutationen, die als Treibermutationen eingeordnet werden, und diese sind im Unterschiede zur CML auch nicht spezifisch für die Ph negativen MPN.

Auch wenn ein Therapiemonitoring im Vergleich zur CML nur in wenigen Fällen notwendig ist, so kann dies insbesondere nach Stammzelltransplantation oder nach Gabe von Ruxolitinib indiziert sein. Bei Stammzelltransplantation ist der Therapieerfolg mit dem Nachweis einer kompletten molekularen Remission verknüpft, aber auch unter Ruxolitinib und unter Interferontherapie kann die Allellast der Treibermutation den Erfolg der Therapie anzeigen (Haslam and Langabeer, 2016; Jovanovic et al., 2013; Koehler et al., 2015). Die Methoden, die hierbei zum Einsatz kommen, müssen eine Sensitivität aufweisen, die zur MRD Diagnostik bei der CML vergleichbar ist. Der Nachweis eines mutierten Allels vor dem Hintergrund von 1.000 gesunden Allelen gleichbedeutend mit einer Sensitivität von 0,1 % ist somit mindestens zu gewährleisten, um den Status einer *major molecular response* anzugeben. Die meisten veröffentlichten Ansätze nutzen die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) mit mutationsspezifischen Primern (Jovanovic et al., 2013; Kröger et al., 2007; Siebolts et al., 2010). In den letzten Jahren setzen sich zunehmend weitere Techniken wie die digitale PCR (dPCR) und neue Sequenzierverfahren durch.

In der Primärdiagnostik kommen im Unterschied zur CML in erster Linie DNA-Sequenziermethoden oder PCR Verfahren zum Einsatz, da es sich um Punktmutationen oder Deletionen und Insertionen und nicht um komplexe Translokationen wie beim Philadelphiachromosom handelt.

Die molekularen Tests zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung werden an Blutproben, Knochenmarkaspiraten oder formalinfixiertem und paraffineingebetteten (FFPE) Material durchgeführt. Dabei handelt es sich um gemischtes Zellmaterial mit einer oft nur sehr geringen Anzahl an mutierten Allelen vor einem dominierenden Wildtyphintergrund. Daher muss eine entsprechende Sensitivität der molekularbiologischen Untersuchungsmethode gewährleistet sein. Insbesondere bei Knochenmarkbiopsien oder Aspiraten von Patienten mit fortgeschrittener Markraumfibrose kann die mesenchymale Zellproliferation den neoplastischen Zellanteil stark überlagern. Die klassische Sangersequenzierung hat eine Sensitivität von ca. 20 %, so dass mit dieser Methode in diesem besonderen diagnostischem Ansatz ein hoher Anteil an falsch negativen Ergebnissen zu erwarten ist (Adamson et al., 1976; Sanger et al., 1992). Weitere Techniken wie der Nachweis eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), die amplifikationsrefraktäre PCR (*amplification refraction mutation system*, ARMS) und die qPCR in Kombination mit Hybridisierung sowie die Pyrosequenzierung und die Parallelsequenzierung haben die notwendige Sensitivität und können in der Primärdiagnostik gut eingesetzt werden (Hochberg et al., 2003; Kröger et al., 2007; Ronaghi et al., 1996, 1998; Shammaa et al., 2010).

Bei der digitalen PCR (dPCR) wird jedes Zielfragment während der gesamten Reaktion in einem einzelnen Kompartiment getrennt amplifiziert und am Ende der Reaktion detektiert. Hieraus resultiert eine direkt quantifizierbare, hochsensitive Methode mit einer Sensitivität von deutlich unter 0,01 %. Bei zunehmend sinkenden Anschaffungskosten wird sich diese Methodik in den kommenden Jahren vermutlich weiter verbreiten. NGS ist ebenfalls eine potentiell hochsensitive Methodik, die jedoch bei der geforderten Sensitivität eine hohe Sequenziertiefe fordert und damit extrem kostenintensiv ist. Zudem wird diese Methode grundsätzlich im Rahmen einer Paneldiagnostik eingesetzt, bei der gleichzeitig zahlreiche Gene untersucht werden. Somit ist das NGS

zwar sehr gut für die primäre Diagnostik geeignet, jedoch bei bekannter Mutation im Sinne einer Kontrolluntersuchung mit Fokus auf nur einen genomischen Abschnitt eher nicht rentabel (Abdelhamid et al., 2013; Anelli et al., 2016; Haslam and Langabeer, 2016; Kirschner et al., 2015).

1.4 Klonalität als Prinzip der malignen Neoplasie

Die formale Tumorgenese beschreibt die allgemeine Entwicklung von initialen Zellschäden bis zur lebenslimitierenden malignen Neoplasie. Die Neoplasie ist definiert als eine klonale Zellexpansion ausgehend von zumeist einer einzelnen Zelle mit einer Schädigung (Initiation), die zu einer vom Zellverband nicht kontrollierbaren autonomen Proliferation (Promotion) und oft zu einer längeren Lebensspanne der Tumorzellen führt. Je nach Art der Schädigung handelt es sich primär entweder um eine benigne oder bereits maligne und somit potentiell metastasierende Neoplasie. Die pathologischen Veränderungen des Erbgutes, die zur ungesteuerten Proliferation des Tumors geführt haben, werden in diesem klonalen Prozess bei Progression lokal oder durch Metastasierung naturgemäß an die nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben, da ansonsten der neoplastische Prozess zum Erliegen käme (Böcker et al., 2012; Riede und Werner, 2017).

Ein häufiges Prinzip der Tumorgenese ist eine durch Noxen induzierte Mutation, die als Treibermutation bezeichnet wird, wenn sie zu einer Initiation und / oder Proliferation führt. Eine Treibermutation allein bestimmt nicht, ob eine Neoplasie maligne oder benigne ist. Beispiele hierfür sind *KRAS-* und *BRAF-* Mutationen, die sich in vielen malignen Neoplasien zeigen (z.B. malignes Melanom, kolorektales Karzinom oder Pankreaskarzinom), jedoch auch in benignen Läsionen mit wenig präkanzerösem Potential in hoher Frequenz gefunden werden (z.B. Nävuszellnävus, tubuläres Adenom des Kolons mit niedriggradiger intraepithelialer Neoplasie oder pankreatische intraepitheliale Neoplasie low grade (PanIN1a und b)) (Carneiro et al., 2010; Griewank, 2015; Hosoda und Wood, 2016; Neumann et al., 2015). Der nächste Entwicklungsschritt kann im Rahmen der Tumorevolution durch weitere erworbene genomische

Veränderungen im Sinne von Kotreibermutationen folgen. Viele benigne Neoplasien haben die Potenz zu einer malignen Entartung und in einigen Fällen ist eine Abfolge von genomischen Veränderungen in der Entwicklung des Tumors mit fortschreitend aggressivem biologischen Verhalten, wie z.B. der Adenom- Karzinom- Sequenz beim kolorektalen Karzinom beschrieben worden (Snover, 2011; Vogelstein et al., 1988).

Jede maligne Neoplasie ist trotz der Einteilung in diagnostische Kategorien in ihrer Biologie einzigartig und nicht jede ist durch eine Treibermutation getrieben. Innerhalb einer Entität gibt es Tumoren mit definierter Treibermutation, während andere zusätzlich zu den Treibermutationen mehrere sogenannte Kotreibermutationen aufweisen, die offensichtlich in der Evolution des Tumors einen weiteren Selektionsvorteil bieten und entweder mit einer hohen Penetranz im gesamten Tumor oder nur in bestimmten Arealen des Tumors in einer subklonalen Ausprägung gefunden werden können (Jamal-Hanjani et al., 2017). Eine weitere Gruppe von Tumoren ist assoziiert mit Defekten in DNA-Reparaturmechanismen der Zellen und akkumuliert zahlreiche passagäre Mutationen ohne weitere Effekte auf die Physiologie der Zelle. Diese sogenannte Tumormutationslast (*tumor mutational burden*, TMB) mit der Möglichkeit der Bildung von Neoantigenen auf der Tumorzelloberfläche rückt zunehmend als prädiktiver Biomarker in den Fokus der Therapie mit immunmodulatorischen Medikamenten (Champiat et al., 2014; Lawrence et al., 2013; Rizvi et al., 2015).

Bei entsprechender Fragestellung kann also eine Treibermutation durch ihr Auftreten im gesamten Tumor einschließlich der Metastasen dazu genutzt werden, den klonalen Ursprung des jeweiligen Tumoranteils zu beweisen. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn bei Patienten mit mehreren synchronen malignen Neoplasien eine histomorphologische Zuordnung von Metastasen nicht möglich ist. Auch im Rahmen der *Liquid Biopsy* Diagnostik zum Nachweis von Resistenzmutationen im Hinblick auf die Therapieplanung ist der parallele Nachweis der zuvor definierten Treibermutation hilfreich, um zu beweisen, dass überhaupt zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) in der untersuchten Blutplasmaprobe vorhanden war (Dahl und Klotten, 2015; Dahl et al., 2015).

Der Klonalitätsnachweis kann bei vielen lymphoproliferativen Erkrankungen, im Unterschied zu anderen malignen Neoplasien, durch den Nachweis eines klonalen Rearrangements von B- und T- Zellrezeptorgenen geführt werden. Zu diesem Zweck wird die Eigenschaft der Lymphozyten ausgenutzt, im Verlauf ihrer physiologischen Reifung eine für die Zelle individuelle Genumlagerung zu erfahren, die für eine möglichst breite Immunantwort des Körpers benötigt wird. Diese Umlagerung führt zu unterschiedlich langen Gensegmenten innerhalb einer Zellpopulation, die nach Amplifikation mit entsprechenden Konsensprimern (BIOMED2) mittels Polymerasekettenreaktion zu einer Gaußschen Verteilungskurve der Fragmente im Elektropherogramm führt und ein polyklonales und somit physiologisches Muster zeigt. Im Falle einer malignen Zellproliferation wird in der Regel ein einheitlich großes Fragment amplifiziert, welches sich als monoklonaler Peak darstellt, der zu einer definitiven Diagnose im Kontext anderer Befunde beitragen kann und der es zudem ermöglicht, zu definieren, ob verschiedene Lokalisationen einer Erkrankung von demselben Tumorklon abstammen (Klapper and Kreipe, 2015; Langerak et al., 2012).

1.5 Sensitivität molekularpathologischer Testverfahren

Bei molekularpathologischen Testverfahren stehen die Sensitivität, die Spezifität, die Richtigkeit (Erkennung und Vermeidung systematischer Fehler) und die Präzision der Ergebnisse im Vordergrund (Bettstetter et al., 2015). Die Sensitivität ist dabei definiert als ein Maß für die richtig positiven Ergebnisse im Verhältnis zur Gesamtzahl der positiven Ergebnisse.

Insbesondere bei PCR- basierten Verfahren, bei denen die zu untersuchende DNA stark amplifiziert wird, ist die Sensitivität limitiert, wenn das mutierte Allel nur in geringer Frequenz vorhanden ist und von gesunden Allelen überdeckt wird. Verschiedene Techniken haben dabei unterschiedliche Limitationen für die Nachweisgrenze. Beispielsweise benötigt die herkömmliche Sangersequenzierung eine Frequenz von 20 bis 25 % des mutierten Allels (auch: Allellast) um die Mutation sicher anzeigen zu können. Im Rahmen der

molekularpathologischen Diagnostik ist es Aufgabe des Pathologen, vor der DNA-Extraktion die Tumoranteile am Durchlichtmikroskop auf den histologischen Schnittpräparaten aufzufinden, zu markieren und den Tumorzellgehalt in Prozent in dem markierten Anteil vor dem Hintergrund der nicht-neoplastischen Zellen (z.B. Stromazellen, Entzündungszellen) zu quantifizieren, um festzustellen, ob die Sensitivität der gewählten molekularen Detektionsmethode ausreichend ist. Sensitivere molekulare Testverfahren sind in der Routinediagnostik weit verbreitet. Dazu zählen die Pyrosequenzierung mit einer Sensitivität von 5 bis 10 %, die Parallelsequenzierung mit 0,1 bis 10 % (je nach Sequenziertiefe) sowie sondenbasierte PCR-Verfahren mit 1 bis 5 % und die Verfahren der digitalen PCR (dPCR) mit 0,01 bis 1% (Diaz and Bardelli, 2014). Zusätzlich können viele dieser Techniken mit entsprechendem technischen Aufwand, wie z.B. *wild-type-blocking* PCR, bezüglich ihrer Sensitivität deutlich gesteigert werden (Link-Lenczowska et al., 2018; Perricone et al., 2017; Siebolts et al., 2010).

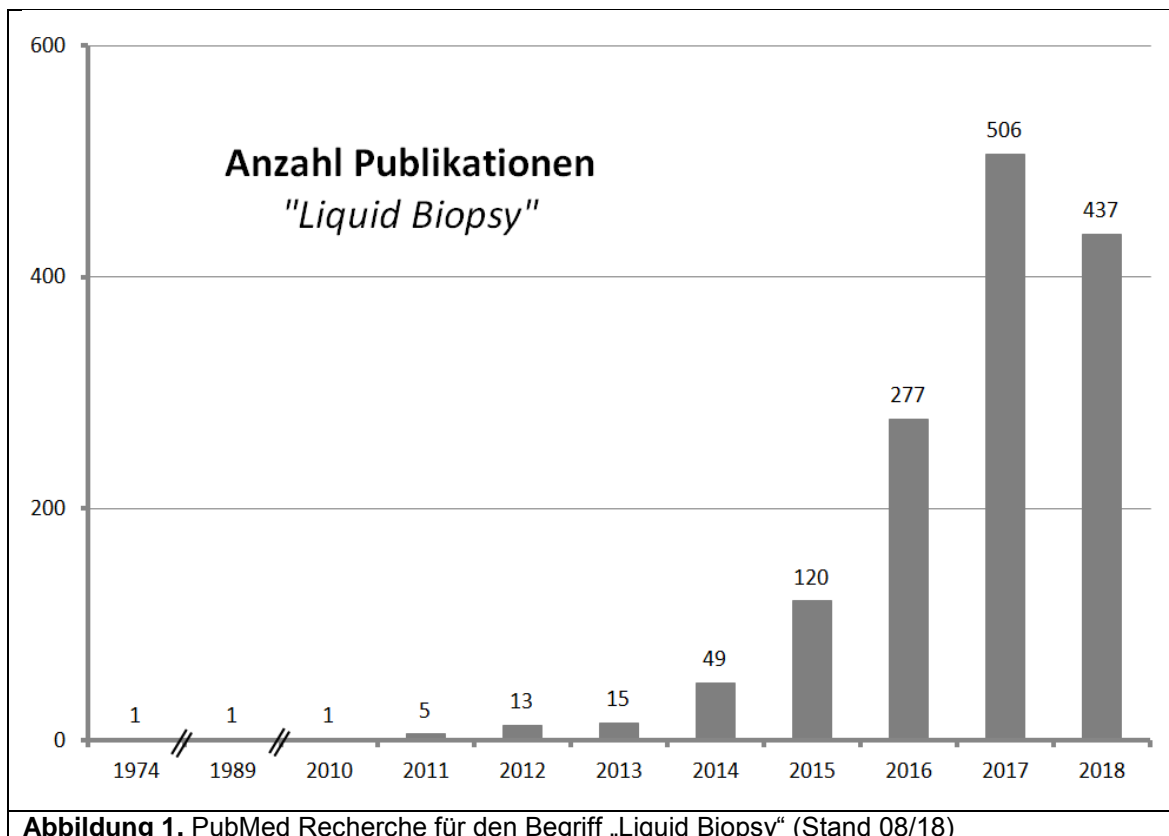
Diese erhöhte technische Sensitivität wird benötigt, wenn subklonale Resistenzmutationen mit geringer Allelfrequenz untersucht werden sollen, oder wenn der Tumorzell- oder DNA-Gehalt entweder nicht vorab evaluiert werden kann (Blutproben, Knochenmarkpunktate, Punktate anderer Körperflüssigkeiten) oder in einer Suspension die neoplastischen Zellen nicht ausreichend von nichtneoplastischen Zellen getrennt werden können (Zellausstriche, Zytospins).

1.6 Nachweis von tumorassoziierten Mutationen im Blut (Liquid Biopsy)

1.6.1 Historie und Definition

Die erste Erwähnung in der NCBI- PubMed Datenbank für den Begriff „Liquid Biopsy“ stammt aus dem Jahr 1974. In dieser Arbeit wird die Möglichkeit einer Diagnostik an Synovialpunktaten im Rahmen von Gelenkerkrankungen behandelt (Sorrells, 1974). Erst viel später wurde die Verwendung des Begriffs

in der heutigen Bedeutung im Kontext der molekularen Tumordiagnostik in einem Kongressbeitrag auf dem „International Symposium on Minimal Residual Disease“ erstmals veröffentlicht (Lianidou et al., 2010). Seitdem kam es zu einem regelrechten Boom bei der Verwendung des Begriffs „Liquid Biopsy“ gemessen an der Anzahl der veröffentlichten wissenschaftlichen Artikel (Abbildung 1).



Die erste Erwähnung von zellfreier DNA (cfDNA) in peripherem Blut stammt von Mandel und Metais aus dem Jahr 1948, jedoch wurde diese vielversprechende Entdeckung für die nächsten 30 Jahre nicht weiter verfolgt (Kubackzova et al., 2017; Mandel and Metais, 1948). Erst 1977 kam es zu weiteren Untersuchungen zu cfDNA an peripherem Blut. Dabei konnten im Vergleich mit gesunden Studienteilnehmern bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (Lunge, Niere, Prostata und Ovar) cfDNA Mengen um mehr als das Hundertfache gefunden werden. Schon damals wurde beschrieben, dass die Menge an cfDNA nach therapeutischer Bestrahlung deutlich abnahm und dass das Persistieren der Werte ein prognostisch ungünstiger Marker war (Leon et al., 1977).

Der Begriff „Liquid Biopsy“ (LBx) im zurzeit gebräuchlichen onkologischen Kontext bezeichnet den diagnostischen Nachweis von Tumorzellen, Exosomen oder freier Tumor-DNA in flüssigem biologischen Gewebe, in erster Linie Blut (Plasma), im Sinne einer nicht invasiven (anglo- amerikanischer Sprachgebrauch) oder besser minimal invasiven Diagnostik (Dahl et al., 2015; Hofman and Popper, 2016).

Die professionelle Nutzung der diagnostischen Möglichkeiten der LBx Methodik wurde erst durch Nutzung herausragender Erkenntnisse auf den Gebieten der Tumorgenetik, Pharmakotherapie, molekularbiologischer Techniken und durch die zunehmenden Erfahrungen im Rahmen der molekularpathologischen Diagnostik an histologischen Präparaten ermöglicht. So war es vor 20 Jahren undenkbar, im Rahmen der LBx die erforderlichen Sensitivitäten für die sichere Detektion von Mutationen und gar mehrerer Mutationen gleichzeitig zu erreichen. Insbesondere die Innovation der Parallelsequenziergeräte und die damit erreichte umfassende Darstellung somatischer Veränderungen im Tumorgenom schaffte die Grundlagen für einen zielführenden Einsatz der LBx (Kaul, 2017).

Ein großer Nutzen der Liquid Biopsy Diagnostik wird allgemein in der hohen Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials gesehen. So ist es in vielen Fällen, insbesondere bei soliden Tumoren und bei Rezidiven, nur unter hohem medizinischen Aufwand und teils mit einem nicht zu unterschätzenden Risiko für den Patienten möglich, an histologisches oder auch zytologisches Material aus dem Primärtumor oder einer Metastase zu gelangen. Dagegen ist die Entnahme einer Blutprobe als minimal invasives Verfahren in den meisten Fällen unproblematisch jederzeit durchführbar. Bereits heute werden in der molekularpathologischen Routinediagnostik zur weiteren Therapiestratifizierung von Patienten mit fortgeschrittenem und unter Therapie progressivem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Mutationsanalysen zum Nachweis einer häufig auftretenden Resistenzmutation im *EGFR*- Gen (p.T790M) durchgeführt (Domínguez-Vigil et al., 2018; Huang et al., 2017).

Zum heutigen Stand gilt allerdings für die meisten Entitäten, dass die histologische Diagnostik, insbesondere die Erstdiagnostik einschließlich der

molekularpathologischen Charakterisierung am Gewebematerial von Exstirpaten, Resektaten oder Biopsien nach wie vor als Goldstandard gesehen wird (Bardelli and Pantel, 2017; Bettegowda et al., 2014; Dahl and Kloten, 2015; Siebolts et al., 2018).

1.6.2 Analyten im Rahmen der Liquid Biopsy Diagnostik

Die beiden häufigsten Analyten im Rahmen der Liquid Biopsy Diagnostik sind die sogenannten zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells – CTC) oder die zellfreie DNA (cell free DNA – cfDNA) im Blut, die als zirkulierende Tumor-DNA (circulating tumor DNA – ctDNA) bezeichnet wird, wenn sie aus Tumorzellen stammt. Dabei wird im Rahmen der meisten Studien davon ausgegangen, dass es sich bei den im peripheren Blut vorliegenden CTCs und der ctDNA um sogenannte Querschnittsanalyte des zu untersuchenden Tumors handelt, d.h. dass die eventuell vorhandene molekulare Heterogenität des Tumors in verschiedenen Lokalisationen in Gänze durch die LBx abgebildet wird (Bardelli and Pantel, 2017). Damit wäre es möglich, repräsentative therapeutische Schlüsse bezüglich einer möglichen molekularen Tumorerheterogenität zu ziehen. Auch wäre es möglich, einen durch therapieinduzierte Tumorevolution nur lokal auftretenden molekularen Resistenzmechanismus früh zu detektieren. Bei hämatologischen Neoplasien werden in den meisten Fällen die neoplastischen Zellen direkt in das ihnen eigene Kompartiment des Bluts abgegeben. Dabei kann von einer gleichmäßigen Ausschwemmung von Tumorzellen ausgegangen werden, die zu einer vollständigen Repräsentanz des Tumors im Blut führt. Bei soliden Tumoren geschieht die Abgabe von Tumorzellen nur bei fortgeschrittenem Tumorwachstum mit Anschluss an Lymph- und Blutgefäßbahnen in Form einzelner zirkulierender Zellen. Die Anzahl dieser Zellen nimmt mit der Menge an Tumorzellen im Organismus, der sogenannten Tumorlast, weiter zu. Dabei ist fraglich, inwieweit die spärliche Anzahl zirkulierender Tumorzellen den Gesamtumor ausreichend charakterisiert oder ob einzelne, beispielsweise nekrotische oder besonders große Tumoranteile, überrepräsentiert werden (Diaz and Bardelli, 2014).

Weitere Analyte, wie tumorspezifische Exosomen, freie RNA, freie micro-RNA (miRNA) oder auch die sogenannten tumorgeprägten Thrombozyten (tumor educated platelets – TEP), werden aktuell mit hohem Aufwand international erforscht, jedoch in den aktuellen wissenschaftlichen Publikationen im Rahmen der Tumordiagnostik lediglich als hoffnungsvolle Analyten für die Zukunft diskutiert (Best et al., 2018; Finotti et al., 2018; Manicone et al., 2017).

Zum heutigen Zeitpunkt und Stand der Technik werden insbesondere Studien mit der Analyse von ctDNA im Rahmen der Tumordiagnostik durchgeführt. Die wenigen Studien, die die Freisetzung und Detektion von CTCs und ctDNA direkt vergleichen, zeigen für die ctDNA gestützte Diagnostik eine höhere Sensitivität (Bettegowda et al., 2014).

1.6.3 Mechanismen der Freisetzung in das periphere Blut

Die einfachste Form der Freisetzung von Tumorzellen in das Blut findet sich bei den malignen Neoplasien hämatopoietischer Zellen. Hier ist das Knochenmark als Entstehungsort der Erkrankung physiologischer Weise dazu entwickelt, die neu entstandenen Zellen in das Blut abzugeben. Somit handelt es sich bei der sogenannten leukämischen Ausschwemmung von neoplastischen Zellen hämatopoietischen Ursprungs um die einfachste Form der CTCs.

Der Anteil der neoplastischen Zellen im Blut ist dabei abhängig von der Art, der Verteilung und der Dauer bzw. Aggressivität der Erkrankung. Eher extramedullär imponierende hämatologische und auch lymphatische Tumore schwemmen nicht in dem Maß in das Blut aus wie generalisierte, systemische hämatologische und lymphatische Erkrankungen, die auf Grund ihrer Lage im Knochenmark bzw. im lymphatischen System einen erleichterten Zugang der grundsätzlich nicht kohäsiven Tumorzellen in das Blut haben (Kubackova et al., 2017). Bei den vorgenannten Erkrankungen ist ctDNA ebenso nachweisbar wie bei soliden Tumoren und kann somit als Analyt zur Diagnostik zusätzlich eingesetzt werden (Kubackova et al., 2017). Insbesondere bei hämato- und lymphoproliferativen Erkrankungen mit leukämischer Ausschwemmung ist jedoch die Analyse der Tumorzellen naturgemäß methodisch einfacher.

Ganz anders stellt sich die Situation bei den soliden Tumoren dar. Von soliden Tumoren spricht man bei malignen Neoplasien nicht disperser Organe wie es das hämatopoietische und das lymphatische System darstellen. Dazu gehören alle epithelialen Tumore (Karzinome), Binde- und Stützgewebstumore (Sarkome), neurogene und neuroektodermale Tumore sowie Keimzelltumore. Die Mechanismen der Freisetzung von CTC und ctDNA sind generell nicht abschließend geklärt (Siravegna and Bardelli, 2016). Man geht heute davon aus, dass es sowohl eine aktive Freisetzung im Rahmen von Sekretion als auch eine passive Freisetzung durch Apoptose und Tumornekrose gibt (Diaz and Bardelli, 2014). Dabei unterscheidet sich die Länge der ctDNA Fragmente je nach Mechanismus der Freisetzung. Für ctDNA aus nekrotischen Arealen findet man eher eine Fragmentlänge von 1000 bp während apoptotische ctDNA deutlich kürzer mit 160 bis 500 bp nachzuweisen wird (Heitzer et al., 2015; Mouliere et al., 2011; Wyllie, 1980). Der größere Anteil der ctDNA stammt aus apoptotischen Zellen und ist insbesondere auch abhängig von Lage, Größe und Vaskularisierung des Tumoranteils sowie von individuellen Parametern des Patienten (Bettegowda et al., 2014; Diehl et al., 2008; Fan et al., 2008; Furuki et al., 2018).

Die relative Menge der ctDNA vor dem Hintergrund der cfDNA in einer Blutprobe ist neben dem Status des Tumors auch von weiteren Faktoren abhängig. Insbesondere frische Verletzungen, was auch auf einen frisch operierten Patienten zutreffen kann, akute und auch chronische Entzündungen sowie die gewählte Entnahmetechnik, aber auch sportliche Aktivitäten können zu einer hohen Menge an cfDNA führen, vor deren Hintergrund die ctDNA naturgemäß kaum noch detektierbar ist (Beiter et al., 2011; Diaz and Bardelli, 2014)

Während die CTC im peripheren Blut lange überleben und als sogenannte schlafende Tumorzellen Monate und Jahre im Organismus zirkulieren können, ist die ctDNA einer sehr kurzen Halbwertszeit von nur eineinhalb bis zwei Stunden unterworfen (Diaz and Bardelli, 2014). Somit handelt es sich dabei um eine wirkliche Momentaufnahme der Menge und Zusammensetzung der cfDNA.

1.6.4 Anwendungsmöglichkeiten der Liquid Biopsy

Die heute zur Verfügung stehenden technischen Verfahren zur Detektion und Charakterisierung von Tumor-DNA mit hoher Sensitivität und paralleler Darstellung multipler genetischer Aberrationen eröffnen Möglichkeiten für die Liquid Biopsy Diagnostik (LBx) im klinischen Alltag für bestimmte Fragestellungen der Patientenversorgung. Führende Fragestellungen sind hierbei der Einsatz der LBx (1) im Rahmen der Diagnostik von malignen Neoplasien, (2) beim Monitoring zur Prognoseabschätzung nach Therapie und (3) Erkennung von Frührezidiven, (4) zum Nachweis molekularer Resistenzmechanismen sowie (5) zur Darstellung der molekularen Heterogenität fortgeschrittener Tumorleiden.

Tumorscreening und Erstdiagnose

Ein zukünftig möglicher und aktuell hinsichtlich seiner Anwendbarkeit diskutierter Einsatz der LBx ist das Tumorscreening zur Früherkennung von neoplastischen Erkrankungen. Vor allem für solide Tumoren, aber auch für viele lymphoproliferative Erkrankungen gilt der Grundsatz, dass eine kurative Therapie der Erkrankung umso besser gelingen kann, je früher der Tumor diagnostiziert wird. Oftmals ist eine chirurgische Entfernung des Tumors dann für eine Heilung ausreichend. Ein Charakteristikum von malignen Erkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose ist das Dilemma, dass die Tumoren erst in einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium klinisch auffällig werden. Aus diesem Grund wurde vor allem für häufige und prognostisch ungünstige Tumorarten ein sogenanntes Tumorscreening für eine bessere Früherkennung eingeführt. Bekannte Beispiele hierfür sind das Brustkrebsscreening mit dem Einsatz von Ultraschall- und Mammographieverfahren, der Nachweis von Blut im Stuhl (Hämoculttest) oder Koloskopie bei kolorektalen Karzinomen oder auch das Screening für den Serummarker PSA (prostataspezifisches Antigen) zur Früherkennung des Prostatakarzinoms (Coldman et al., 2014; Schreuders et al., 2015; Tabayoyong and Abouassaly, 2015). Die Einführung von Liquid Biopsy basierten Screeningverfahren erscheint heute noch kaum realisierbar, wird aber in zahlreichen Publikationen bei inzwischen erreichbarer hoher technischer

Sensitivität als durchführbar und geradezu euphorisch beschrieben (z.B. Cohen et al., 2018; Diaz, 2014). Andere Experten sehen die Anwendung der Liquid Biopsy basierten Screeningverfahren eher kritisch und verweisen auf die durchweg retrospektiven Studien mit supervidierten und weitgehen balancierten Studienkollektiven mit optimierten Kontrollgruppen. Zahlreiche Fragen sind zudem bislang ungeklärt. Dazu gehören die noch unverstandene Variabilität der Konzentration zellfreier DNA und gerade durch die hohe technische Sensitivität die potentielle Möglichkeit der falsch positiven Ergebnisse durch (1) die Freisetzung von Mutationen entzündlich überlagerter benigner Neoplasien wie z.B. Darmpolypen, Hautnävi und intraepithelialer Neoplasien der Pankreasgänge im Rahmen einer chronischer Pankreatitis und (2) die klonale Hämatopoiese unklarer Prognose (CHIP, siehe Kapitel 1.2). Im Rahmen eines Screeningverfahrens ist jedoch gerade ein falsch positiver Befund problematisch da dies für den individuellen Patienten ein hohes Maß an Verunsicherung und für das medizinische System hohe Folgekosten durch die notwendige Befundabklärung bedeutet (Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Pathologie z.B. Dahl et al., 2015; Siebolts et al., 2018).

Schon heute können für die Primärdiagnose von einigen Tumorerkrankungen krankheitsdefinierende genetische Aberrationen im Rahmen der LBx insbesondere bei myeloproliferativen Erkrankungen genutzt werden. Ein verbreitet in der Routine eingesetztes Beispiel ist die Detektion der *BCR-ABL1* Translokation bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Bei Nachweis dieser Translokation kann ohne eine weitere Untersuchung bei entsprechender Klinik die Diagnose zuverlässig gestellt werden (Swerdlow et al., 2017). Andere genomische Veränderungen, die zwar nicht spezifisch für eine bestimmte Erkrankung sind, können ebenfalls für eine sichere Erstdiagnose herangezogen werden, wenn hierzu weitere diagnostische Verfahren und klinische Parameter synoptisch betrachtet werden. Beispiele sind die *JAK2* p.V617F Mutation bei den klassischen myeloproliferativen Neoplasien und die *BRAF* p.V600E Mutation bei der Haarzelleukämie (Swerdlow et al., 2017). Für die soliden Tumoren ist eine solche Diagnostik bei einzelnen Erkrankungen denkbar, jedoch zurzeit noch nicht im Rahmen der Routinediagnostik vorgesehen. Sie

kann jedoch in seltenen Fällen angewendet werden, wenn eine bioptische Sicherung aufgrund der Lokalisation des Tumors oder bei schlechtem Allgemeinzustand des Patienten nicht möglich ist (Schmiegel and Pox, 2017; Ukena and Schönfeld, 2018).

Tumormonitoring

Eine vielversprechende Einsatzmöglichkeit der LBx ist das Tumormonitoring nach Therapie. Dabei können prinzipiell zwei Einsatzgebiete voneinander unterschieden werden. (1) Der Einsatz zum Nachweis eines frühen, sogenannten molekularen Rezidivs der Erkrankung mit dem Ziel einer frühestmöglichen therapeutischen Intervention und (2) die prognostische Einteilung der Patienten nach potentiell kurativer Therapie zur Planung einer eventuell notwendig erscheinenden adjuvanten Therapie.

Bei beiden Ansätzen ist es notwendig, den Tumor vor der Therapie molekular zu charakterisieren, um genomische Aberrationen zu definieren, die im Anschluss an die Behandlung mit hochsensitiven Verfahren am peripheren Blut detektierbar sind.

So ist z.B. die chronische myeloische Leukämie definiert durch eine aktivierende *BCR-ABL* Translokation, das sogenannte Philadelphiachromosom, mit einer reziproken Umlagerung von Anteilen der Chromosomen 9 und 22 (de Klein et al., 1982). Wie schon in Absatz 1.3.1 beschrieben, kommt dem Nachweis der Allellast des Philadelphiachromosoms im Rahmen der Therapie eine besondere Rolle zu. Zur frühestmöglichen Detektion eines molekularen Rezidivs, welches schon Wochen vor dem klinischen Rezidiv nachgewiesen werden kann, werden Blutproben auf mRNA- Ebene mittels quantitativer PCR auf das Vorhandensein des *BCR/ABL1* Transkripts überprüft, um den Patienten eine frühestmögliche Behandlung zu ermöglichen. Mit Hilfe eines international vergleichbaren Standards (*international scale* (IS)) können diese Werte schon seit vielen Jahren international verglichen und eingeordnet werden (Alikian et al., 2017; Branford et al., 2006). Ein derartiges Monitoring ist auch für andere myeloproliferative Neoplasien und solide Tumoren möglich, bei denen eine entsprechende Mutation bekannt ist, wird jedoch in der Routinediagnostik

bislang noch nicht als Standard angewendet (Koehler et al., 2015; Maier et al., 2013; Siebolts et al., 2010).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Liquid Biopsy im Tumormonitoring liegt in der individuellen Prognoseabschätzung nach initialer Therapie der Erkrankung. Tie et al. konnten zeigen, dass der Nachweis von zuvor definierten Treibermutationen drei Wochen nach operativer Therapie von Dickdarmkrebs im Stadium UICC II mittels Liquid Biopsy als negativer prognostischer Marker den klassischen Prognoseparametern, wie histologischem Grading, lokaler Tumorausbreitung oder Mikrosatellitenstatus des Tumors deutlich überlegen ist (Tie et al., 2016). Ähnliche Ergebnisse konnten für andere solide Tumoren wie z.B. das Mammakarzinom gezeigt werden (Garcia-Murillas et al., 2015). Auch bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien kann das molekulare Monitoring eingesetzt werden, wie Daten einer eigenen Studie bei Patienten mit *JAK2* p.V617F positiver primärer Myelofibrose (PMF) mit Zustand nach myeloablativer Therapie und Stammzelltransplantation zeigen (Lange et al., 2013; Siebolts et al., 2010).

Molekulare Resistenzmechanismen und Tumorheterogenität

Bei der personalisierten Therapie von fortgeschrittenen Tumorleiden mit Kinaseinhibitoren kann es im Therapieverlauf zur Entwicklung von molekularen Resistenzen kommen. Diese werden durch den spezifischen Selektionsdruck des Medikaments auf den Tumor hervorgerufen und können zu einer molekularen Heterogenität des Tumors führen (Camidge et al., 2014; Gainor et al., 2016). Die in diesem Rahmen auftretenden passagären Mutationen verursachen häufig Konformitätsänderungen am onkogenen Zielprotein, so dass die Kinaseinhibitoren keine entsprechende Bindung eingehen können (Camidge et al., 2014; Gainor et al., 2016; Schmitt and Brümmendorf, 2016). Aus der Liquid Biopsy kann in solchen Fällen ctDNA gewonnen und mittels sensitiver Verfahren auf bekannte Resistenzmechanismen untersucht werden. Für das *EGFR*- mutierte Adenokarzinom der Lunge mit Resistenz gegen eine entsprechend angewandte Therapie mit Kinaseinhibitoren ist ein solches Nachweisverfahren für die aktivierende Resistenzmutation *EGFR* p.T790M

inzwischen zugelassen und wird von den Leitlinien vor Einsatz einer medikamentösen Zweitlinientherapie gefordert (Ukena and Schönfeld, 2018).

2. Zusammenfassende Darstellung der Publikationen

Dieses Kapitel enthält eine zusammenfassende Darstellung der dieser Arbeit zugrundeliegenden wissenschaftlichen Publikationen zur molekularen Charakterisierung und Diagnostik ausgewählter hämatologischer und solider maligner Neoplasien.

2.1 Molekulare Charakterisierung maligner Neoplasien

Grundvoraussetzung für die Prävention, die Klassifizierung und die Therapie von malignen Neoplasien ist das Verständnis sowohl der kausalen als auch der formalen Pathogenese der einzelnen Krebserkrankung. Im Folgenden werden die Ergebnisse eigener Forschungsarbeiten zu strukturellen und funktionalen Prozessen im Sinne der formalen Pathogenese ausgewählter Krebserkrankungen zusammengefasst.

2.1.1 Molekulare Charakterisierung myeloproliferativer Neoplasien

Ein wesentlicher Schwerpunkt der publizierten Forschungsergebnisse war die Charakterisierung myeloproliferativer Neoplasien, insbesondere der Polyzythämia vera (PV), primären Myelofibrose (PMF) und chronischen myeloischen Leukämie, *BCR-ABL1* (CML).

Die PV ist in der chronischen Phase der Erkrankung charakterisiert durch eine trilineare hämatopoietische Proliferation mit Ausschwemmung neoplastischer, jedoch funktioneller Zellen der Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese. Weitgehend proliferativ inaktive CD34 positive Vorläufer- oder auch Progenitorzellen werden zudem vermehrt in das Blut abgegeben und können mittels technischer Verfahren im Rahmen von Blutentnahmen separiert werden. Diese Zellen besitzen trotz reduzierter oder fehlender Rezeptorexpression eine erhöhte Sensitivität für Wachstumsfaktoren. Zur

weiteren Erforschung dieses Phänomens wurden in einer frühen Studie Progenitorzellen aus dem peripheren Blut von PV Patienten mit Progenitorzellen von Patienten mit einer sekundären, reaktiven Polyzythämie und gesunden Blutspendern verglichen. Dabei zeigten PV Progenitorzellen eine höhere morphologische Pleomorphie einschließlich einer elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Vermehrung von Mitochondrien und vergrößerter Golgi-Apparate. Nach Kurzzeitkultur wiesen diese Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zudem eine Dysregulation von Wachstumsrezeptoren und eine erhöhte proliferative Aktivität auf (Wickenhauser et al., 2003).

In einer anschließenden Arbeit zur Abschätzung der Verteilung von klonalen und nicht-klonalen mononukleären Zellen und Progenitorzellen als Subgruppe wurden Patienten mit bekannter Trisomie 8 und 9 mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an zytologischem Material untersucht. 90 % der mononukleären und 79% der Progenitorzellen wiesen eine Trisomie auf. Somit konnte zum ersten Mal eine nicht neoplastische Zellfraktion von 10 % bzw. 21 % aufgezeigt und zudem die zur Zeit der Veröffentlichung noch diskutierte These einer klonalen Erkrankung gestützt werden (Siebolts et al., 2005).

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, ist die Grundlage einer Neoplasie die klonale Expansion von Zellen, die häufig im Krankheitsverlauf durch eine Treibermutation unterhalten wird. Für die Polyzythämia vera (PV) konnte erst 2005 eine Treibermutation im *JAK2* Gen gefunden werden. Vorher wurde die definitive Einordnung als Neoplasie diskutiert, was sich auch in der damaligen Namensgebung dieser Gruppe als chronische myeloproliferative Erkrankungen widerspiegelt. Erst 2008, nach allgemein akzeptierter klonaler Genese der Erkrankung, erfolgte die Umbenennung in myeloproliferative Neoplasien (siehe Kapitel 1.1).

Patienten mit PMF und Patienten mit CML im Progress unter initialer Therapie können mit einer allogenen Stammzelltransplantation potentiell kurativ behandelt werden. Da viele dieser Patienten auf Grund ihres hohen Lebensalters oder krankheitsbedingt in einem für eine myeloablative Chemotherapie zu schlechten Allgemeinzustand sind, wird häufig eine

sogenannte dosisreduzierte Konditionierung angewendet. In einem ähnlichen methodischen Ansatz wie oben beschrieben, konnte bei Patienten mit primärer Myelofibrose nach Stammzelltransplantation und dosisreduzierter Konditionierung gezeigt werden, dass in den ersten drei Monaten nach Therapie die Anzahl der neoplastischen Empfängerprogenitorzellen mit einer Frequenz von 30 bis 40 % im Knochenmark der Patienten persistierten. Ein Jahr nach der Transplantation stellte sich eine nahezu vollständige Reduktion der neoplastischen Progenitorzellen mit maximal 8 % bei vollständigem Chimerismus im Blut ein (Thiele et al., 2007).

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen von Patienten mit stammzelltransplantierte CML zeigte, dass bei CML-Patienten trotz vollständiger Spenderhämatopoiese im Blut ein persistierender Anteil an neoplastischen Progenitorzellen von bis zu 26 % im Knochenmark verblieb. Dies korreliert mit der allgemein schlechteren Prognose von CML-Patienten nach Stammzelltransplantation und dosisreduzierter Konditionierung verglichen mit Patienten mit primärer Myelofibrose. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die CML Progenitorzellen über bessere Strategien zur Umgehung der Tumorreduktion durch das spenderspezifische Immunsystem verfügen (Siebolts et al., 2008).

Die These, dass embryologische Stammzellen Oberflächenmarker exprimieren, die sie vor der Immunreaktion von zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen schützen, konnte mittlerweile bestätigt werden. Des Weiteren ist bekannt und konnte in der zitierten Arbeit gezeigt werden, dass auch adulte hämatopoietische Stammzellen protektive Faktoren wie den Serin Proteaseinhibitor 6 (Serpin 6) exprimieren. Diese Expression nimmt bei weiterer Differenzierung in die linienspezifischen Progenitorzellen ab. Diese Ausstattung der adulten Stammzellen ist wahrscheinlich notwendig, um die regeneratorsche Aktivierung von Stammzellen vor dem Immunsystem zu schützen (Utermöhlen et al., 2009).

Mittels einer methodisch aufwendigen Studie an Progenitorzellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit Polyzythämia vera wurden zum ersten Mal auf Transkriptionsebene mittels cDNA-Array und Polymerasekettenreaktion die

Unterschiede in der mRNA- Expression im Vergleich zu gesunden Probanden dargestellt. Insbesondere das Phänomen einer aberranten Expression der DNA- abhängigen Proteinkinaseuntereinheit *KU86* kann in Verbindung gebracht werden mit der Akkumulation von chromosomalen Schäden, der Vermehrung der Blutzellen (Hämatokrit) im peripheren Blut der Patienten und der verlängerten Lebensdauer der neoplastischen Progenitorzellen (Siebolts et al., 2009a).

2.1.2 Weitere Studien zur molekularen Charakterisierung maligner Neoplasien

Die molekularbiologische Technik der Parallelsequenzierung erlaubt es seit einigen Jahren, an geringen Mengen DNA aus formalinfixierten und paraffinarchivierten Tumorproben eine Vielzahl an genomischen Veränderungen in einem Ansatz zu charakterisieren. Insbesondere Erkrankungen, deren wissenschaftliche Erforschung auf Grund der geringen Häufigkeit vorher nicht systematisch möglich war, konnten somit aus diagnostischen Archiven in größeren Mengen zusammengestellt und untersucht werden. Ziel ist neben der einfachen genomischen Phänotypisierung auch die Beschreibung möglicher zukünftiger Zielstrukturen für eine gezielte Therapie.

In einer Studie an 33 blastischen plasmazytoiden dendritischen Zellneoplasien (BPDCN), einer seltenen malignen hämatologischen Neoplasie, wurden mittels Parallelsequenzierung an formalinfixierten und paraffinarchivierten Proben 50 häufige Tumorgene untersucht. Dabei konnten vor allem Mutationen im MAP-Kinase Signalweg (*KRAS*, *NRAS*, *MET*, *BRAF*) und weitere aus anderen Malignomen bekannte und häufige Treibermutationen (*APC*, *RB1*, *RET1*, *CDKN2A*, *PTEN* und *TP53*) gefunden werden. Die häufigsten Mutationen waren Punktmutationen im *NRAS*-Gen und Deletionen im *CDKN2A*-Gen in jeweils 27,3 % der Fälle (Stenzinger et al., 2014).

In einem ähnlichen methodischen Ansatz wurden die seltenen duktaalen, tubulären und laktierenden Adenome der Mamma untersucht. Dabei konnte die histomorphologische Unterscheidung der Adenome durch das Auftreten jeweils

unterschiedlicher Mutationen je Subgruppe unterstützt werden. Fünf von neun untersuchten duktalem Adenomen wiesen Punktmutationen in den Genen *AKT1*, *PIK3CA* und *GNAS* auf. Drei von sechs tubulären Adenomen waren charakterisiert durch Punktmutationen in den Genen *MET* und *FGFR3*. Die drei untersuchten laktierenden Adenome zeigten keine Mutationen. Insbesondere beim duktalem Adenom kann die Kenntnis über die Art der Mutationen in schwierigen Fällen in der Differentialdiagnose zum Fibroadenom der Mamma genutzt werden, da diese in ca. 60 % der Fälle eine Mutation im Exon 2 des *MED12* Gens aufweisen (Volckmar et al., 2017).

In der molekularbiologischen Erforschung der formalen Pathogenese von malignen Neoplasien wird häufig zum Auffinden von funktionell interessanten Biomarkern zunächst eine molekulare Screeningmethode durchgeführt. Dieses Prinzip wurde auch in der bereits erwähnten Studie zur cDNA Expressionsanalyse an PV Progenitorzellen angewandt (Siebolts et al., 2009a). In späteren wissenschaftlichen Kooperationen kamen ähnliche methodische Ansätze zur Anwendung. In einer Studie an acht Melanomzelllinien wurde ein RNA Interferenz Screening (RNAi screen) durchgeführt. Mittels dieses Verfahrens konnten Kandidatengene des *mitogen-activated protein kinase* Signalwegs (MAPK) für weitere funktionelle Untersuchungen mittels *knockdown* ermittelt werden. Durch Supprimierung der Expression von *PRKCB* (Proteinkinase C beta) konnte in den untersuchten Zelllinien eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate, der in vitro Koloniebildung und der Migrationsaktivität erreicht werden. Des Weiteren wurde eine deutlich erhöhte Expression in Geweben von untersuchten Primärtumoren und Metastasen von Melanomen im Vergleich zu benignen Hautnävi festgestellt. Weitere funktionelle Untersuchungen zeigten zudem, dass die Wachstumsrate von Melanomzelllinien mittels eines spezifischen *PRKCB*- Inhibitors deutlich gesenkt werden konnte (Schönherr et al., 2014).

Mittels einer komparativen Genexpressionsprofilierung an humanen Brustkrebszelllinien konnte das Gen Etonukleosidtriphosphat Diphosphohydrolase 5 (*ENTPD5*) als Zielgen des in zahlreichen malignen Neoplasien vorkommenden TP53-Proteins mit aktivierender Mutation beschrieben werden. *ENTPD5* wirkt im endoplasmatischen Retikulum, wo es in

den Prozess der Bildung einer Tertiärstruktur von sich bildenden Membranproteinen involviert ist. Dabei scheint die *TP53* Mutation über die Wirkung von *ENTPD5* klonales Wachstum, Migration, Invasion und Lungenmetastasierung im Mausmodell zu induzieren (Vogiatzi et al., 2016).

Eine weitere funktionelle Studie untersuchte die Rolle von *CLAUDIN_1* auf die Aggressivität des follikulären Schilddrüsenkarzinoms (*follicular thyroid carcinoma*, FTC). *CLAUDIN_1* ist als Transmembranprotein ein Teil der Zellverbindung *tight junction* und trägt wesentlich zur Festigkeit der interzellulären Verbindung bei. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte an FTC- Metastasen und Zelllinien gezeigt werden, dass die membranäre Expression deutlich vermindert und die nukleäre Expression konsekutiv deutlich erhöht war. Mittels funktioneller Untersuchungen an Zelllinien mit Induktion bzw. Reduktion der *CLAUDIN_1* Expression wurde dargestellt, dass dies einen signifikanten Effekt auf die Aggressivität der Zellen im Sinne einer gesteigerten Migrationsaktivität und Invasion hatte und die Proteinkinase C als Steuerungsfaktor die Expression von *CLAUDIN_1* kontrolliert (Zwanziger et al., 2015).

2.1.3 Vergleichender Nachweis tumorassoziierter Mutationen zur Tumorcharakterisierung

Wie bereits in Kapitel 1.4 ausgeführt, bietet eine vorhandene Treibermutation den neoplastischen Zellen einen hohen Selektionsvorteil und wird im Primärtumor oder der Metastase in den meisten Tumorzellen nachzuweisen sein. Durch die Analyse von Treibermutationen kann daher beim Auftreten verschiedener Tumormanifestationen überprüft werden, ob es sich um Anteile des bereits bekannten Tumors oder um Anteile eines unabhängig entwickelten Zweitmalignoms handelt. Weiterhin können subklonale Mutationen wie Kotreibermutationen oder passagäre Mutationen genutzt werden, verschiedene Subklone zu charakterisieren, um weitere Informationen über Prognose und Resistenzentwicklungen zu bekommen.

Ein Patient mit einem Adenokarzinom der Lunge und einer aktivierenden Deletion im *EGFR* Exon 19 wurde initial mit einem für diese Situation zugelassenen spezifischen Kinaseinhibitor therapiert. Nach kurzer Zeit und nach anfänglichem Therapieansprechen wurde radiologisch eine Progression des Tumors festgestellt. Daraufhin wurde eine Resistenzbestimmung mittels *Liquid Biopsy* durchgeführt und im *EGFR* Gen die Resistenzmutation p.T790M gefunden. Im Anschluss wurde die Therapie auf eine Zweitlinientherapie mit einem für diese Resistenzsituation wirksamen Tyrosinkinaseinhibitor umgestellt. Wider Erwarten sprach der Patient nicht auf die geänderte Therapie an und blieb hinsichtlich der Tumorerkrankung progressiv. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde im interdisziplinären Konsens beschlossen, eine erneute Biopsie progressiver Tumoranteile durchzuführen. Im histologischen Ergebnis wurde nun ein kleinzellig neuroendokrines Lungenkarzinom festgestellt, gegen das die gewählte Therapie nicht wirken konnte. In einer molekularpathologischen Analyse wurde auch in diesem Tumoranteil trotz unterschiedlichem Tumortyp die gleiche Deletion im Exon 19 des *EGFR* Gens gefunden (Moeller et al., 2018). Dies legt den Schluss nahe, dass sich unter der initialen Therapie des Patienten zwei parallele Resistenzen ausgebildet hatten, sowohl eine p.T790M Mutation als auch eine histologische Transformation in ein kleinzellig neuroendokrines Lungenkarzinom (Abbildung 2).

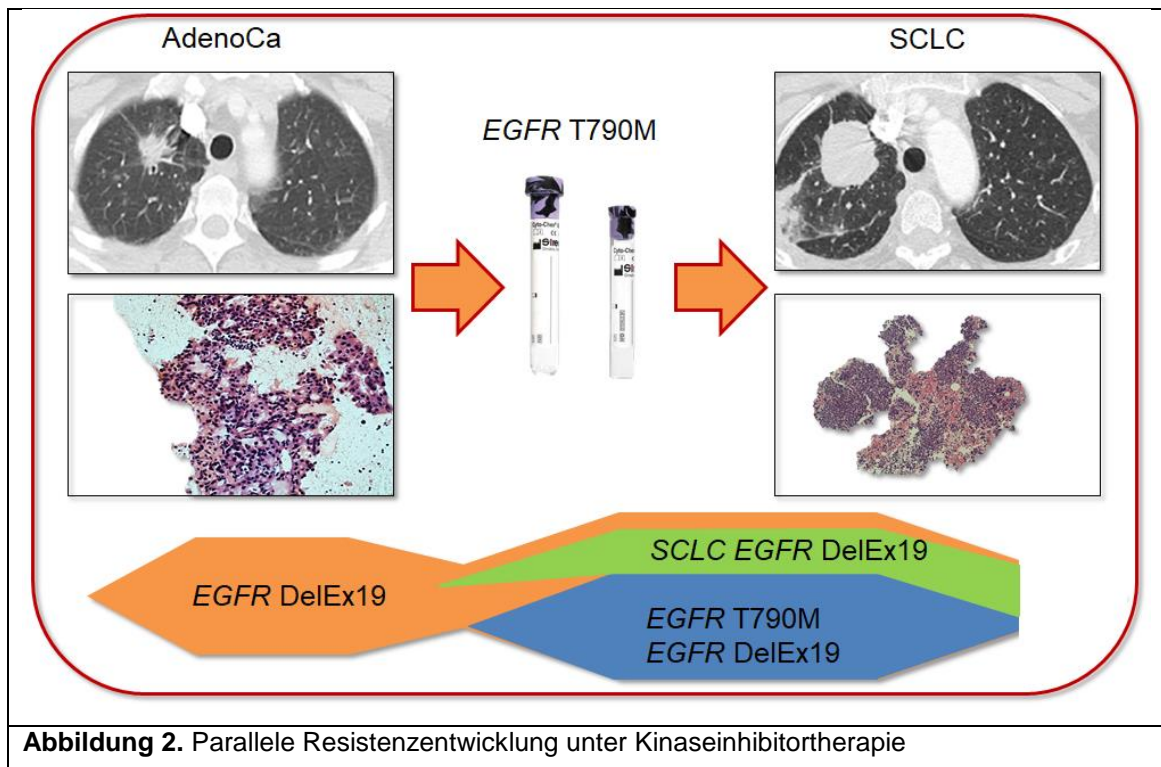


Abbildung 2. Parallele Resistenzentwicklung unter Kinaseinhibitorthherapie

Dieses Beispiel zeigt das Potential des Nachweises von Treibermutationen zur Charakterisierung von malignen Neoplasien. Bei dem geschilderten Fall ist davon auszugehen, dass sich das kleinzellig neuroendokrine Lungenkarzinom unter der Selektion der initialen Tyrosinkinaseinhibitorthherapie entwickelt hat, da zum einen die detektierte Exon 19 Deletion in primären kleinzelligen neuroendokrinen Lungenkarzinomen nicht beschrieben ist und zum anderen die Variabilität der Deletionen im Exon 19 sehr hoch ist und die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei unabhängig voneinander entwickelte Tumoren an der gleichen Stelle mit der gleichen Deletion entwickelt haben, als sehr niedrig anzusehen ist. Dieser Fall zeigt auch, dass die *Liquid Biopsy* Diagnostik trotz der allgemeinen Euphorie für diese Methodik (siehe Kapitel 1.6) zwar den molekularen Resistenzmechanismus beschreiben konnte, aber naturgemäß nicht den parallelen Resistenzmechanismus der histologischen Transformation. Dies bedeutet, dass die Kombination aus histologischem und molekularem Befund den höchsten Informationsgewinn bietet.

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung einer synoptischen Diagnostik unter Berücksichtigung von molekularpathologischen und morphologischen Befunden, berichteten wir im Rahmen einer Falldarstellung eines Patienten mit

BCR-ABL1 positiver CML. Nach initial erfolgreicher Therapie mit dem Kinaseinhibitor Imatinib sank die Mutationslast im peripheren Blut. Mittels histomorphologischer Diagnostik an der zusätzlich durchgeführten Knochenmarkstanze konnte jedoch zeitlich eine deutliche Population neoplastischer lymphoider Blasten als Resistenzmechanismus festgestellt werden. Im Verlauf entwickelte der Patient trotz angepasster medikamentöser Therapie eine schwere Immundefizienz und starb drei Monate nach Diagnose (Markert et al., 2009).

Seröse Borderlinetumoren des Ovars (s-BOT) gelten als Vorläuferläsionen der low-grade Ovarialkarzinome und sind häufig mit einer peritonealen und lymphonodalen Tumorausbreitung vergesellschaftet. Trotz dieser typischen Merkmale einer malignen Neoplasie ist die Einordnung der s-BOT als definitive Malignome ebenso in der Diskussion wie ihre klonale Genese. Zur Klärung der Frage einer klonalen Herkunft wurden in einer Studie an 13 serösen Borderlinetumoren des Ovars Treibermutationen in den Genen *BRAF* und *KRAS* mittels Pyrosequenzierung am Primärtumor und an jeweils 2 bis 6 korrespondierenden Tumormanifestationen in Lymphknoten und Peritoneum untersucht. Die Diversität der möglichen Mutationen gerade im *KRAS* Gen erlaubt es dabei, bei gleichartiger Mutation im Primärtumor und einer weiteren Tumormanifestation eine klonale Genese zu postulieren. Im Ergebnis zeigten die in unserer Studie untersuchten peritonealen und lymphonodalen Tumoranteile in allen Fällen exakt die gleiche Treibermutation wie der Primärtumor, was die These einer klonalen Expansion weiter stützt (Horn et al., 2014).

2.1.4 Vergleichende Klonalitätsanalyse zur differentialdiagnostischen Charakterisierung lymphoproliferativer Neoplasien

Viele lymphoproliferative Erkrankungen manifestieren sich primär in Lymphknoten mit diagnostisch nutzbaren charakteristischen morphologischen Veränderungen. Somit ist die Erstdiagnose zumeist dem Pathologen durch histomorphologische und immunhistochemische Untersuchung eines

exstirpierten Lymphknotens vorbehalten. Eine weitere unterstützende diagnostische Methode ist der Nachweis einer klonalen Expansion von Lymphozyten mittels der Klonalitätsanalyse von T- und B- Zellrezeptorgenen (siehe Kapitel 1.4). Die klonale Zellpopulation zeigt sich in dieser molekularen Methodik im Elektropherogramm als ein dominierender Peak mit relativ zurückgedrängtem Hintergrund der nicht- klonalen lymphozytären Zellen. Mit Hilfe dieser Information können verschiedene Lokalisationen des Tumors verglichen werden mit der Fragestellung, ob es sich jeweils um den gleichen Tumorklon handelt, ob eine Evolution des Tumors zu einem multiklonalen Geschehen mit verschiedenen Subklonen stattfand oder ob es sich differentialdiagnostisch um zwei unterschiedliche Malignome handelt.

In einer Studie an 40 Patienten mit B- Zellymphomen wurden Klonalitätsanalysen an korrespondierenden paraffinierten Proben von Lymphknoten und Knochenmarkbiopsien durchgeführt und hinsichtlich der klonalen Peaks im Elektropherogramm verglichen. Dies ist insbesondere von klinischer Bedeutung, da die Mitbeteiligung des Knochenmarks bei diesen Malignomen einen negativen prognostischen Parameter darstellt. Rein histomorphologisch ist die Detektion von klonalen lymphoproliferativen Mikroinfiltraten oftmals eine diagnostische Herausforderung. Unsere Daten zeigten in 50 % der Fälle im Knochenmark einen identischen klonalen Peak in der Klonalitätsanalyse im Sinne einer definitiven Ausbreitung der vordiagnostizierten Grunderkrankung in das Knochenmark. In 25 % der Fälle zeigten sich jeweils zusätzliche klonale Peaks als Zeichen einer fortschreitenden Evolution des Tumors mit subklonalen Tumoranteilen. Diese Studie zeigt die diagnostisch unterstützende Aussagekraft der Klonalitätsanalyse im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik von lymphoproliferativen Erkrankungen (Odenthal et al., 2008).

2.2 Entwicklung spezialisierter molekularpathologischer Verfahren

2.2.1 MicroRNA als möglicher Analyt in der molekularpathologischen Diagnostik

Wie in der Einleitung und insbesondere in Kapitel 1.6.2 beschrieben, ist die Kenntnis über die biologischen Eigenschaften eines Analyten essentiell zur korrekten Interpretation der Ergebnisse. Dazu gehören die Kenntnis über die Freisetzung und Verteilung des Analyten genauso, wie das Wissen über mögliche artifizielle Degradation im Verlauf der Analytextraktion aus der Körperflüssigkeit oder dem Gewebe.

Im Rahmen der molekularpathologischen Routinediagnostik wurde in den letzten Jahrzehnten viel Erfahrung mit der Extraktion von DNA und RNA aus formalinfixierten und paraffinierten Gewebeproben gesammelt. Dabei ist insbesondere die quantitative Analyse von messenger RNA (mRNA) problematisch, da diese einzelsträngige Nukleinsäurespezies anfälliger gegen zersetzende Prozesse ist, als die durch ihren doppelsträngigen Aufbau besser geschützte DNA.

Zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Studie zur Charakterisierung von microRNA aus formalinfixierten und paraffinierten Gewebe gab es keine systematischen Untersuchungen dazu, ob quantitative Analysen an dieserart archiviertem Gewebe möglich sind. Zu diesem Zweck untersuchten wir zwei repräsentative microRNA Spezies mittels quantitativer PCR an 86 formalinfixierten und paraffinierten Archivproben aus Leber, Mamma, Knochenmark (nach Entkalkung), Lymphknoten und Kolon. In einem zweiten Ansatz wurde die Expression der gleichen microRNA Spezies aus nativem Mauslebergewebe und parallel bearbeiteten fixierten Proben der gleichen Lebern verglichen um den Einfluss von Fixationsart und Fixationszeit von 12 bis 72 Stunden zu ermitteln. Die Ergebnisse zeigten, dass microRNA aus formalinfixiertem und paraffinierten Material hinsichtlich der Expression gut analysierbar ist. Die Dauer der Fixation hatte keinen signifikanten Einfluss auf

die Analysen. Bei der Fixationsart konnten Unterschiede im Expressionslevel dargestellt werden. Grundsätzlich ist die Analyse nach jeder untersuchten Fixationsart möglich, jedoch sollten nicht unterschiedlich fixierte Gewebe miteinander verglichen werden. Eine signifikant schlechtere Qualität der microRNA ergab sich nach Fixation mit ungepuffertem Formalin und bei Zustand nach Entkalkung. Für die retrospektive Analyse von formalinfixiertem und paraffinierten Gewebe sind die gut dokumentierten Paraffinarchive der Pathologen von besonderem Interesse. Ein erstaunliches Ergebnis dieser Studie war, dass eine Lagerung der Paraffinblöcke über 7 Jahre keinerlei Einfluss auf die quantitativen Untersuchungen der microRNA hatte. Erst nach 10 bis 20 Jahren nimmt der Gehalt der extrahierbaren microRNA signifikant ab, wobei vergleichende semiquantitative Expressionsanalysen weiterhin möglich erscheinen (Siebolts et al., 2009b).

2.2.2 Hochsensitives Verfahren zum Nachweis der JAK2 p.V617F Punktmutation zur molekularen Diagnostik und zum Monitoring an peripherem Blut

Die molekularpathologische Diagnostik am peripheren Blut wird im Kontext der soliden Tumoren bei Nachweis von genomischen Veränderungen aus zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) oder an zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) im Allgemeinen als *Liquid Biopsy* bezeichnet. Prinzipiell werden auch bei Mutationsanalysen am peripheren Blut von Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie CTCs oder ctDNA untersucht. Der Unterschied besteht darin, dass die Tumorzellen durch die Art der Erkrankung in hoher Zahl in das periphere Blut abgegeben werden und somit der molekularen Charakterisierung leichter zugänglich sind. In Kapitel 1.1 und 1.2 werden die Grundlagen der molekularen Veränderungen bei myeloproliferativen Neoplasien erläutert. Kapitel 1.3 beschreibt die molekulare Diagnostik dieser Erkrankungen und in Kapitel 1.5 und 1.6 wird detailliert auf die Beschränkungen und Möglichkeiten der molekularen Diagnostik eingegangen. Vor dem so skizzierten theoretischen Hintergrund sind die folgenden Studien zum molekularen

Monitoring von Patienten mit *JAK2* p.V617F positiver myeloproliferativer Neoplasie einzuordnen.

Das Ziel einer jeden Therapie maligner Neoplasien ist die Kuration, also die vollständige Heilung, des Patienten bzw. der palliative Ansatz, idealerweise mit der Transformation einer schnell fortschreitenden und damit lebensbedrohlichen Erkrankung in einen chronischen Prozess. Die posttherapeutisch diagnostischen Ansätze bezeichnet man als Monitoring, sie dienen der Verlaufskontrolle und der möglichst frühzeitigen Erkennung von Rezidiven der Erkrankung. In einer initialen technischen Studie an vier Patienten mit primärer Myelofibrose und Zustand nach allogener Stammzelltransplantation wurde die prädiktive Kraft der Voraussage zu einem klinischen Rezidiv der Erkrankung getestet. Dazu wurden sequentielle Knochenmarkbiopsien vor und nach Stammzelltransplantation mit einer konventionellen allelspezifischen quantitativen PCR mit einer technischen Sensitivität von 1 % untersucht und die Ergebnisse mit den klinischen Daten korreliert. In einem zweiten Ansatz wurden die gleichen Proben mit einer zweiten, selbst entwickelten sensitiveren Methodik analysiert, die die allelspezifische quantitative PCR mit einer starken Blockierung der nicht mutierten Allele (*wild-type-blocking*) kombiniert. Die so erzeugte technische Sensitivität lag bei 0,001 % bzw. dem Nachweis eines mutierten Allels vor dem Hintergrund von 100.000 nicht mutierten Allelen. Durch die so erzeugte hohe technische Sensitivität konnte, anders als mit der konventionellen Technik, eine minimale residuale Tumormasse schon direkt nach der potentiell kurativen Therapie erkannt und ein Rezidiv Monate bis Jahre vor den klinischen Zeichen des Rezidivs angezeigt werden (Siebolts et al., 2010).

Diese Methodik wurde im Folgenden in der Routinediagnostik der Universitätsklinik Köln und Leipzig bei Patienten mit entsprechendem molekularem Profil und Zustand nach Stammzelltransplantation zum Therapiemonitoring erfolgreich eingesetzt. Dies wurde im Rahmen einer prospektiven Studie publiziert, die 70 sequentielle Blutproben und Knochenmarkbiopsien von 30 Patienten mit *JAK2* p.V7617F positiven myeloproliferativen Neoplasien und Zustand nach allogener Stammzelltransplantation, unter Anwendung der zuvor publizierten Methode auf residuale molekulare Erkrankung einschloss. Wie zuvor beschrieben, konnte

der Nachweis einer molekularen Resterkrankung ein klinisches Rezidiv schon Monate vorher ankündigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass am Tag 28 nach allogener Stammzelltransplantation der Nachweis einer residualen Allellast von $> 1\%$ ein signifikant höheres Rezidivrisiko und schlechteres Gesamtüberleben vorhersagen konnte (Lange et al., 2013).

Dieses Ergebnis steht in einer Reihe mit Publikationen zum Monitoring einer minimalen Resterkrankung mittels *Liquid Biopsy* nach potentiell kurativer Therapie bei Patienten mit Mammakarzinom und kolorektalem Karzinom und hat ein hohes Potential, schon bald im Rahmen der Routinediagnostik eingesetzt zu werden. Dabei kann unabhängig von der vorliegenden, potentiell kurativ zu behandelnden malignen Neoplasie im Rahmen der Erstdiagnostik am histologischen Material eine Mutationsanalyse mittels Parallelsequenzierung durchgeführt werden. Bei Nachweis einer tumorspezifischen Mutation kann diese im Verlauf mittels *Liquid Biopsy* und einer geeigneten technisch sensitiven Methodik wie z.B. digitaler PCR oder *wild type blocking* allelspezifischer quantitativer PCR zum Monitoring der minimalen Resterkrankung überprüft werden. Im Falle eines Rezidivs kann dann erneut eine Gewinnung histologischen Materials erfolgen, um wiederum mittels Parallelsequenzierung eine mögliche molekulare Resistenzentwicklung zu sichern und gegebenenfalls eine weitere Therapie, im Sinne einer Zweitlinientherapie, mit der erneuten Möglichkeit eines molekularen Monitorings durchzuführen (Abbildung 3).

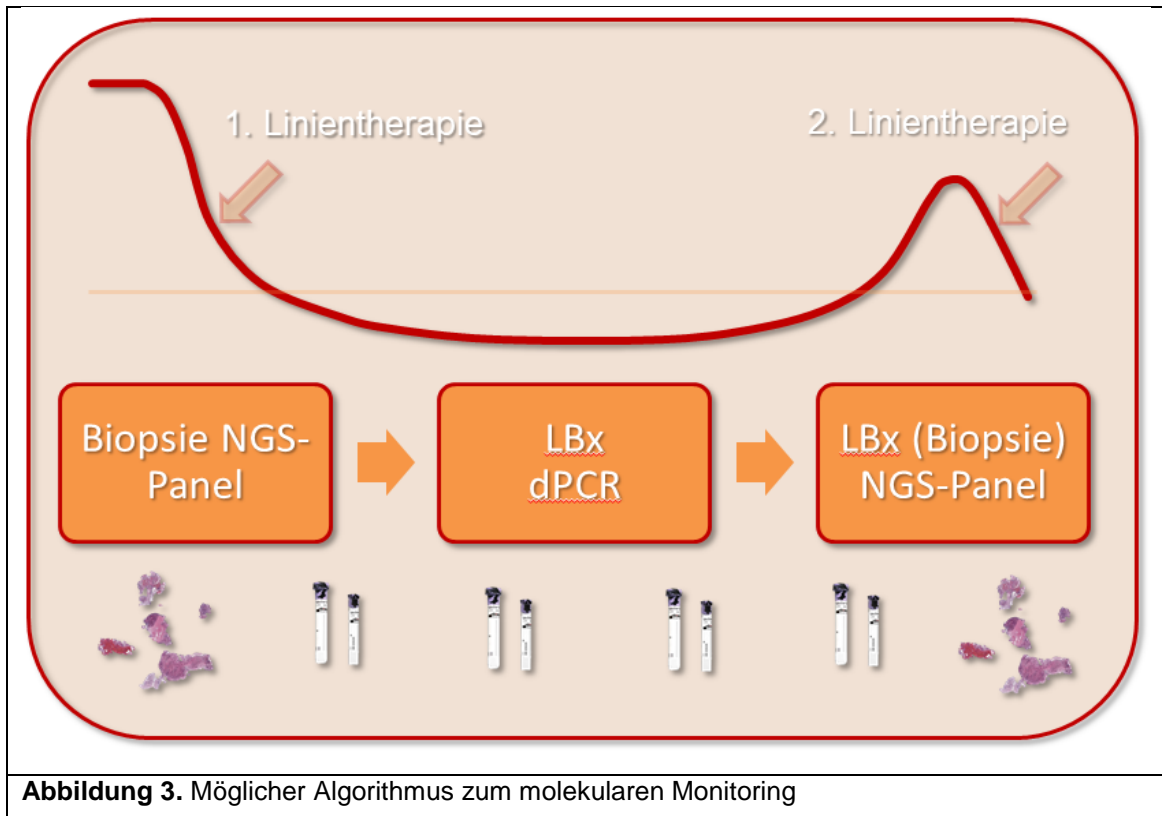


Abbildung 3. Möglicher Algorithmus zum molekularen Monitoring

Dass ein molekulares Monitoring seine diagnostische Aussagekraft auch im Rahmen einer Therapie mit Kinaseinhibitoren entfalten kann, zeigt ein interessanter Fallbericht unter Anwendung der zuvor beschriebenen molekularen Methodik. Ein 50jähriger kaukasischer Patient mit einer *JAK2* p.V617F positiven primären Myelofibrose wurde mit dem für *JAK1/2* spezifischen Kinaseinhibitor Ruxolitinib therapiert. Interessanterweise konnte eine Allellast am Blut und an sequentiellen Knochenmarkbiopsien von 58 % bzw. 85 % festgestellt werden, die erst nach 216 Wochen unter laufender Therapie unter den für die Stammzelltransplantation so wichtigen prädiktiven Wert von unter 1 % gefallen ist. Dabei hatte der Patient während des Untersuchungszeitraums keine klinischen Anzeichen eines Rezidivs der Erkrankung. Ganz offensichtlich verbleibt unter der Kinaseinhibitortherapie eine zwar inaktive, aber vitale Tumorzellpopulation bestehen, bis sie sich auf natürlichem Weg selbst limitiert (Koehler et al., 2015).

2.2.3 Hochsensitives Verfahren zum diagnostischen Nachweis von Treibermutationen an Feinnadelaspiraten von Schilddrüsenknoten

Eine weitere diagnostische Fragestellung, bei der auf Grund des häufig nur sehr geringen Zellgehaltes eine besondere Anforderung an die technische Sensitivität der molekulardiagnostischen Methodik gestellt wird, ist die Diagnostik an Feinnadelaspiraten (FNA) von suspekten Schilddrüsenknoten. FNA von suspekten Schilddrüsenknoten werden routinemäßig gewonnen, da klinisch kaum Möglichkeiten bestehen, die Dignität sicher abzuschätzen. Im Rahmen der nach der Feinnadelaspiration folgenden zytologischen Untersuchungen durch einen erfahrenen Pathologen werden die Ergebnisse in prognostische Gruppen nach BETHESDA in sechs Gruppen eingeteilt. Die Einteilung in die Kategorien IV bis VI führt zu einer chirurgischen Entfernung mit der Möglichkeit einer anschließenden definitiven histomorphologischen Diagnose. Klinisch problematisch sind die zytologischen Gruppen I (diagnostisch nicht auswertbar), II (benigne, follikulärer Knoten) und III (Atypien unklarer Signifikanz). In diesen Fällen wäre eine zusätzliche molekulare Testung mit prognostischer Aussage hilfreich.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der von uns publizierten Studie untersucht, in wie weit verschiedene Methoden geeignet sind, valide Aussagen zu möglichen tumorassoziierten Mutationen zu treffen. An 110 FNA-Ausstrichpräparaten und korrespondierendem chirurgischen Material wurden die bekannten Treibermutationen *BRAF*, *NRAS*, *HRAS* und *KRAS* untersucht. Dabei kamen die quantitative PCR und die Pyrosequenzierung zum Einsatz. Für die untersuchten Mutationen erwies sich die Pyrosequenzierung auf Grund der hohen Spezifität, bei allerdings nur mäßiger Sensitivität, der quantitativen PCR überlegen. Die Aussagekraft konnte bei doppelter Testung mit beiden Methoden nochmals deutlich gesteigert werden (Rehfeld et al., 2013).

In einer weiteren Studie zu diesem Thema wurde an 564 FNA- Ausstrichen von suspekten Schilddrüsenknoten im Vergleich zu vorliegendem chirurgischen Material ein Panel aus sieben Genen mittels quantitativer PCR und Pyrosequenzierung untersucht. Im Anschluss wurde ein Großteil der Patienten über ein Jahr nachbeobachtet. Insgesamt waren die Punktmutation *BRAF*

p.V600E und die Fusion *RET/PTC* zu 98 % und 100 % mit einem malignen Befund assoziiert. Für die *RAS* Punktmutationen und *PAX8/PPARG* Fusion lag die Korrelation mit einem definitiven Malignom nur bei 31 % und 0 %. Diese Werte sind kongruent zu der Beobachtung, dass *RAS* und *PAX8/PPARG* Alterationen häufig auch in benignen Neoplasien zu finden sind, während es nach Literaturangaben für *BRAF* und *RET/PTC* Alterationen kaum Berichte benigner Läsionen gibt. Vor diesem Hintergrund scheint die prädiktive Aussagekraft der Mutationsanalyse von *RAS* und *PAX8/PPARG* an FNA-Material eingeschränkt. Insgesamt konnten lediglich 36 % der in der Studie gefundenen Karzinome, die zuvor der zytologischen Gruppe III (Atypien unklarer Signifikanz) zugeordnet waren, durch die Mutationsanalyse bestimmt werden, so dass aus den vorliegenden Daten keine Empfehlung zu einer flächendeckenden molekularen Diagnostik zum jetzigen Zeitpunkt gegeben werden kann (Eszlinger et al., 2017).

2.3 Eigene Publikationen im Rahmen der Habilitationsschrift in Reihenfolge der Erwähnung in Kapitel 2

Wickenhauser C, Pérez F, **Siebolts U**, Lorenzen J, Varus E, Frimpong S, Thiele J.

2003, Structural, antigenetic and transcriptional characteristics in peripheral blood CD34+ progenitor cells from polycythemia vera patients: evidence for delayed determination.

Int J Oncol 23(2):437-43

Siebolts U, Ates M, Spitz R, Thiele J, Wickenhauser C.

2005, Quantification of clonal hematopoiesis in polycythemia vera.

Virchows Arch, 447(6):947-53

Thiele J, Varus E, **Siebolts U**, Kvasnicka HM, Wickenhauser C, Metz KA, Beelen DW, Ditschkowski M, Zander A, Kröger N.

2007, Dualism of mixed chimerism between hematopoiesis and stroma in chronic idiopathic myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation.

Histol Histopathol, 22(4):365-72

Siebolts U, Thiele J, Zander T, Ditschkowski M, Beelen DW, Kröger N, Fehse B, Wickenhauser C.

2008, Differences in proportion and dynamics of recipient hematopoiesis following hematopoietic cell transplantation in CML and IMF.
Oncol Rep, 19(1):287-92

Utermöhlen O, Baschuk N, Abdullah Z, Engelmann A, **Siebolts U**, Wickenhauser C, Stocking C, Krönke M.
2009, Immunologic hurdles of therapeutic stem cell transplantation.
Biol Chem, 390(10):977-83

Siebolts U, Breuhahn K, Hennecke A, Schultze JL, Wickenhauser C.
2009, Imbalance of DNA-dependent protein kinase subunits in polycythemia vera peripheral blood stem cells.
Int J Cancer, 124(3):600-7

Stenzinger A, Endris V, Pfarr N, Andrulis M, Jöhrens K, Klauschen F, **Siebolts U**, Wolf T, Koch PS, Schulz M, Hartschuh W, Goerdts S, Lennerz JK, Wickenhauser C, Klapper W, Anagnostopoulos I, Weichert W.
2014, Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm.
Oncotarget, 15;5(15):6404-13

Volckmar AL, Leichsenring J, Flechtenmacher C, Pfarr N, **Siebolts U**, Kirchner M, Budczies J, Bockmayr M, Ridinger K, Lorenz K, Herpel E, Noske A, Weichert W, Klauschen F, Schirmacher P, Penzel R, Endris V, Stenzinger A.
2017, Tubular, lactating, and ductal adenomas are devoid of MED12 Exon2 mutations, and ductal adenomas show recurrent mutations in GNAS and the PI3K-AKT pathway.
Genes Chromosomes Cancer, 56(1):11-17

Schönherr M, Bhattacharya A, Kottek T, Szymczak S, Köberle M, Wickenhauser C, **Siebolts U**, Saalbach A, Koczan D, Magin TM, Simon JC, Kunz M.
2014, Genomewide RNAi screen identifies protein kinase C β and new members of mitogen-activated protein kinase pathway as regulators of melanoma cell growth and metastasis.
Pigment Cell Melanoma Res, 27(3):418-30

Vogiatzi F, Brandt DT, Schneikert J, Fuchs J, Grikscheit K, Wanzel M, Pavlakis E, Charles JP, Timofeev O, Nist A, Mernberger M, Kantelhardt EJ, **Siebolts U**, Bartel F, Jacob R, Rath A, Moll R, Grosse R, Stiewe T.
2016, Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5.

Proc Natl Acad Sci USA, 113(52):E8433-E8442

Zwanziger D, Badziong J, Ting S, Moeller LC, Schmid KW, **Siebolts U**, Wickenhauser C, Dralle H, Fuehrer D.

2015, The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. Endocr Relat Cancer, 22(5):819-30

Moeller M, **Siebolts U**, Wickenhauser C, Schuette W.

2018, Non-Small Cell Lung Cancer- Development of Parallel Mechanisms of Resistance.

Pneumologie, 72(7):503-506

Markert E, **Siebolts U**, Odenthal M, Kreuzer KA, Wickenhauser C.

Geteilte Erstautorenschaft

2009, High diagnostic value of morphologic examination and molecular analysis of bone marrow biopsies in a case of BCR-ABL+ CML with clusters of blasts.

Int J Hematol, 89(3):294-7

Horn LC, Höhn AK, Eienkel J, **Siebolts U**.

2014, Monoclonal origin of peritoneal implants and lymph node deposits in serous borderline ovarian tumors (s-BOT) with high intratumoral homogeneity.

Int J Gynecol Pathol, 33(6):592-7

Odenthal M, **Siebolts U**, Ernestus K, Disse D, Dienes HP, Wickenhauser C.

Geteilte Erstautorenschaft

2008, Immunoglobulin heavy chain gene analysis in bone marrow biopsies and corresponding lymph node specimens: dependency on pre-treatment, histological subtype and extension of B-cell lymphoma.

Int J Mol Med, 21(5):569-76

Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M.

2009, Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR.

J Clin Pathol, 62(1):84-8

Siebolts U, Lange T, Niederwieser D, Wickenhauser C.

2010, Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy.

J Clin Pathol, 63(4):370-2

Lange T, Edelmann A, **Siebolts U**, Krahl R, Nehring C, Jäkel N, Cross M, Maier J, Niederwieser D, Wickenhauser C.

2013, JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse.

Haematologica, 98(5):722-8

Koehler A, Hubert K, Lange T, **Siebolts U**, Wickenhauser C, Gopalakrishna P, Niederwieser D, Monecke A, Al-Ali HK.

2015, JAK2V617F molecular remission in a primary myelofibrosis patient treated with ruxolitinib.

Ann Hematol, 94(11):1929-30

Rehfeld C, Münz S, Krogdahl A, Jensen EM, **Siebolts U**, Ferraz C, Bösenberg E, Hegedüs L, Paschke R, Eszlinger M.

2013, Impact of different methodologies on the detection of point mutations in routine air-dried fine needle aspiration (FNA) smears.

Horm Metab Res, 45(7):513-7

Eszlinger M, Böhme K, Ullmann M, Görke F, **Siebolts U**, Neumann A, Franzius C, Adam S, Molwitz T, Landvogt C, Amro B, Hach A, Feldmann B, Graf D, Wefer A, Niemann R, Bullmann C, Klausenke G, Santen R, Tönshoff G, Ivancevic V, Kögler A, Bell E, Lorenz B, Kluge G, Hartenstein C, Ruschenburg I, Paschke R.

2017, Evaluation of a two-year routine application of molecular testing of thyroid fine needle aspirations (FNA) using a 7-gene-panel in a primary referral setting in Germany.

Thyroid, 27(3):402-411

3. Literaturverzeichnis

- Abdelhamid, E., Figeac, M., Renneville, A., Quief, S., Villenet, C., Boyer, T., Nibourel, O., Coiteux, V., Cassinat, B., Lippert, E., et al. (2013). Quantification of JAK2V617F mutation by next-generation sequencing technology. *Am. J. Hematol.* *88*, 536–537.
- Adamson, J.W., Fialkow, P.J., Murphy, S., Prchal, J.F., and Steinmann, L. (1976). Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N. Engl. J. Med.* *295*, 913–916.
- Alikian, M., Gale, R.P., Apperley, J.F., and Foroni, L. (2017). Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol. Detect. Quantif.* *11*, 4–20.
- Alvarez-Larrán, A., Senín, A., Fernández-Rodríguez, C., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Gómez, M., Ferrer-Marin, F., Martínez-López, J., Camacho, L., Colomer, D., et al. (2017). Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.* *178*, 764–771.
- Anelli, L., Zagaria, A., Coccaro, N., Tota, G., Minervini, A., Casieri, P., Impera, L., Minervini, C.F., Brunetti, C., Ricco, A., et al. (2016). Droplet digital PCR assay for quantifying of CALR mutant allelic burden in myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* *95*, 1559–1560.
- Baccarani, M., Pane, F., and Saglio, G. (2008). Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* *93*, 161–169.
- Balligand, T., Achouri, Y., Pecquet, C., Chachoua, I., Nivarthi, H., Marty, C., Vainchenker, W., Plo, I., Kralovics, R., and Constantinescu, S.N. (2016). Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia* *30*, 1775–1778.
- Bardelli, A., and Pantel, K. (2017). Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell* *31*, 172–179.
- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet Lond. Engl.* *365*, 1054–1061.
- Beiter, T., Fragasso, A., Hudemann, J., Niess, A.M., and Simon, P. (2011). Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clin. Chem.* *57*, 633–636.
- Best, M.G., Wesseling, P., and Wurdinger, T. (2018). Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. *Cancer Res.* *78*, 3407–3412.
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Lubner, B., Alani, R.M., et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* *6*, 224ra24.

Bettstetter, M., Dietmeier, W., Hartmann, A., Höfler, H., Merkelbach-Bruse, S., Meyermann, R., Rümmele, P., and Sperling, M. (2015). Leitfaden des Sektorkomitees Pathologie/Neuropathologie für die Validierung von Untersuchungsverfahren in der Molekularpathologie.

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G., and Kreipe, H. (2012). Pathologie (Urban und Fischer Verlag / Elsevier).

Branford, S. (2007). Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 376–383.

Branford, S., Cross, N.C.P., Hochhaus, A., Radich, J., Saglio, G., Kaeda, J., Goldman, J., and Hughes, T. (2006). Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20, 1925–1930.

Camidge, D.R., Pao, W., and Sequist, L.V. (2014). Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 473–481.

Carneiro, F., Hruban, H., and Theise, D. (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System (WHO).

Castagnetti, F., Gugliotta, G., Breccia, M., Stagno, F., Iurlo, A., Albano, F., Abruzzese, E., Martino, B., Levato, L., Intermesoli, T., et al. (2015). Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Leukemia* 29, 1823–1831.

Cazzola, M., and Skoda, R. (2005). Gain of function, loss of control - a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 90, 871–874.

Ceesay, M.M., Lea, N.C., Ingram, W., Westwood, N.B., Gäken, J., Mohamedali, A., Cervera, J., Germing, U., Gattermann, N., Giagounidis, A., et al. (2006). The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia* 20, 2060–2061.

Champiat, S., Ferté, C., Lebel-Binay, S., Eggermont, A., and Soria, J.C. (2014). Exomics and immunogenics: Bridging mutational load and immune checkpoints efficacy. *Oncoimmunology* 3, e27817.

Cohen, J.D., Li, L., Wang, Y., Thoburn, C., Afsari, B., Danilova, L., Douville, C., Javed, A.A., Wong, F., Mattox, A., et al. (2018). Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 359, 926–930.

Coldman, A., Phillips, N., Wilson, C., Decker, K., Chiarelli, A.M., Brisson, J., Zhang, B., Payne, J., Doyle, G., and Ahmad, R. (2014). Pan-Canadian study of mammography screening and mortality from breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 106.

Cortes, J., Quintás-Cardama, A., and Kantarjian, H.M. (2011). Monitoring Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer* 117, 1113–1122.

Dahl, E., and Kloten, V. (2015). [Liquid biopsy analysis using cell-free DNA (cfDNA): Opportunities and limitations]. *Pathol.* 36, 572–578.

- Dahl, E., Jung, A., Fassunke, J., Hummel, M., Penzel, R., Dietmaier, W., and Laßmann, S. (2015). [Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy: positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)]. *Pathol.* 36, 92–97.
- Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6, 372–375.
- Defour, J.-P., Chachoua, I., Pecquet, C., and Constantinescu, S.N. (2016). Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 30, 1214–1216.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* 360, 2289–2301.
- Diaz, L.A. (2014). The promise of liquid biopsy in colorectal cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* 12, 688–689.
- Diaz, L.A., and Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 579–586.
- Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., et al. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* 14, 985–990.
- Domínguez-Vigil, I.G., Moreno-Martínez, A.K., Wang, J.Y., Roehrl, M.H.A., and Barrera-Saldaña, H.A. (2018). The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget* 9, 2912–2922.
- Egan, D., and Radich, J. (2016). Monitoring disease burden in chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *Am. J. Hematol.* 91, 742–746.
- Elf, S., Abdelfattah, N.S., Chen, E., Perales-Patón, J., Rosen, E.A., Ko, A., Peisker, F., Florescu, N., Giannini, S., Wolach, O., et al. (2016). Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov.* 6, 368–381.
- Eszlinger, M., Böhme, K., Ullmann, M., Görke, F., Siebolts, U., Neumann, A., Franzius, C., Adam, S., Molwitz, T., Landvogt, C., et al. (2017). Evaluation of a Two-Year Routine Application of Molecular Testing of Thyroid Fine-Needle Aspirations Using a Seven-Gene Panel in a Primary Referral Setting in Germany. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 27, 402–411.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., and Quake, S.R. (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16266–16271.

- Finotti, A., Allegretti, M., Gasparello, J., Giacomini, P., Spandidos, D.A., Spoto, G., and Gambari, R. (2018). Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review). *Int. J. Oncol.* *53*, 1395–1434.
- Fiorini, A., Farina, G., Reddiconto, G., Palladino, M., Rossi, E., Za, T., Laurenti, L., Giammarco, S., Chiusolo, P., Leone, G., et al. (2006). Screening of JAK2 V617F mutation in multiple myeloma. *Leukemia* *20*, 1912–1913.
- Furuki, H., Yamada, T., Takahashi, G., Iwai, T., Koizumi, M., Shinji, S., Yokoyama, Y., Takeda, K., Tani, N., and Uchida, E. (2018). Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging mutated genes in metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* *44*, 975–982.
- Gainor, J.F., Dardaei, L., Yoda, S., Friboulet, L., Leshchiner, I., Katayama, R., Dagogo-Jack, I., Gadgeel, S., Schultz, K., Singh, M., et al. (2016). Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov.* *6*, 1118–1133.
- Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R.J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I., et al. (2015). Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* *7*, 302ra133.
- Geary, C.G. (2000). The story of chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* *110*, 2–11.
- Gibson, C.J., and Steensma, D.P. (2018). New Insights from Studies of Clonal Hematopoiesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*
- Griewank, K.G. (2015). [Molecular diagnostics of melanomas]. *Pathol.* *36*, 30–36.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., and Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* *36*, 93–99.
- Guglielmelli, P., Biamonte, F., Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Cervantes, F., Maffioli, M., Fanelli, T., Ernst, T., Winkelmann, N., Jones, A.V., et al. (2011). EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* *118*, 5227–5234.
- Haslam, K., and Langabeer, S.E. (2016). Monitoring Minimal Residual Disease in the Myeloproliferative Neoplasms: Current Applications and Emerging Approaches. *BioMed Res. Int.* *2016*, 7241591.
- Heitzer, E., Ulz, P., and Geigl, J.B. (2015). Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin. Chem.* *61*, 112–123.
- Hermans, A., Heisterkamp, N., von Linden, M., van Baal, S., Meijer, D., van der Plas, D., Wiedemann, L.M., Groffen, J., Bootsma, D., and Grosveld, G. (1987). Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* *51*, 33–40.

- Hinds, D.A., Barnholt, K.E., Mesa, R.A., Kiefer, A.K., Do, C.B., Eriksson, N., Mountain, J.L., Francke, U., Tung, J.Y., Nguyen, H.M., et al. (2016). Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood* 128, 1121–1128.
- Hochberg, E.P., Miklos, D.B., Neuberg, D., Eichner, D.A., McLaughlin, S.F., Mattes-Ritz, A., Alyea, E.P., Antin, J.H., Soiffer, R.J., and Ritz, J. (2003). A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 101, 363–369.
- Hofman, P., and Popper, H.H. (2016). Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 469, 601–609.
- Hookham, M.B., Elliott, J., Suessmuth, Y., Staerk, J., Ward, A.C., Vainchenker, W., Percy, M.J., McMullin, M.F., Constantinescu, S.N., and Johnston, J.A. (2007). The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 109, 4924–4929.
- Horn, L.-C., Höhn, A.K., Eibenkel, J., and Siebolts, U. (2014). Monoclonal origin of peritoneal implants and lymph node deposits in serous borderline ovarian tumors (s-BOT) with high intratumoral homogeneity. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* 33, 592–597.
- Hosoda, W., and Wood, L.D. (2016). Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *Surg. Pathol. Clin.* 9, 685–703.
- Huang, W.-L., Chen, Y.-L., Yang, S.-C., Ho, C.-L., Wei, F., Wong, D.T., Su, W.-C., and Lin, C.-C. (2017). Liquid biopsy genotyping in lung cancer: ready for clinical utility? *Oncotarget* 8, 18590–18608.
- Hughes, T.P., and Branford, S. (2009). Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 477–487.
- Hughes, T.P., Morgan, G.J., Martiat, P., and Goldman, J.M. (1991). Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood* 77, 874–878.
- Jaffe, E., Stein, H., and Vardiman, J. (2001). *World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues* (Lyon, France: IARC Press).
- Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., McGranahan, N., Birkbak, N.J., Watkins, T.B.K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D.H., Mitter, R., Rosenthal, R., et al. (2017). Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 376, 2109–2121.
- James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148.
- Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M., and Issa, J.-P.J. (2005). JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias

but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* 106, 3370–3373.

Jovanovic, J.V., Ivey, A., Vannucchi, A.M., Lippert, E., Oppliger Leibundgut, E., Cassinat, B., Pallisgaard, N., Maroc, N., Hermouet, S., Nickless, G., et al. (2013). Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 27, 2032–2039.

Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., and Stegmeier, C. (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012 (Berlin: Robert Koch Institut).

Kantarjian, H., Schiffer, C., Jones, D., and Cortes, J. (2008). Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 111, 1774–1780.

Kaul, K.L. (2017). Preparing pathology for precision medicine: challenges and opportunities. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 471, 141–146.

Kirschner, M.M.J., Schemionek, M., Schubert, C., Chatain, N., Sontag, S., Isfort, S., Ortiz-Brüchle, N., Schmitt, K., Krüger, L., Zerres, K., et al. (2015). Dissecting Genomic Aberrations in Myeloproliferative Neoplasms by Multiplex-PCR and Next Generation Sequencing. *PloS One* 10, e0123476.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., et al. (2013). Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 369, 2379–2390.

Klapper, W., and Kreipe, H. (2015). [Diagnostic molecular pathology of lymphatic and myeloid neoplasms]. *Pathol.* 36, 164–170.

de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Stephenson, J.R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300, 765–767.

Koehler, A., Hubert, K., Lange, T., Siebolts, U., Wickenhauser, C., Gopalakrishna, P., Niederwieser, D., Monecke, A., and Al-Ali, H.K. (2015). JAK2V617F molecular remission in a primary myelofibrosis patient treated with ruxolitinib. *Ann. Hematol.* 94, 1929–1930.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 352, 1779–1790.

Kremer, M., Horn, T., Dechow, T., Tzankov, A., Quintanilla-Martínez, L., and Fend, F. (2006). The JAK2 V617F mutation occurs frequently in myelodysplastic/myeloproliferative diseases, but is absent in true myelodysplastic syndromes with fibrosis. *Leukemia* 20, 1315–1316.

Kröger, N., Badbaran, A., Holler, E., Hahn, J., Kobbe, G., Bornhäuser, M., Reiter, A., Zabelina, T., Zander, A.R., and Fehse, B. (2007). Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 109, 1316–1321.

Kubackova, V., Vrabel, D., Sedlarikova, L., Besse, L., and Sevcikova, S. (2017). Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. *Eur. J. Haematol.* 99, 291–299.

Kujak, C., and Kolesar, J.M. (2016). Treatment of chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.* 73, 113–120.

Lange, T., Edelmann, A., Siebolts, U., Krahl, R., Nehring, C., Jäkel, N., Cross, M., Maier, J., Niederwieser, D., and Wickenhauser, C. (2013). JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. *Haematologica* 98, 722–728.

Langerak, A.W., Groenen, P.J.T.A., Brüggemann, M., Beldjord, K., Bellan, C., Bonello, L., Boone, E., Carter, G.I., Catherwood, M., Davi, F., et al. (2012). EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 26, 2159–2171.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., et al. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214–218.

Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Park, W.S., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2006). Absence of JAK2 V617F mutation in gastric cancers. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 45, 222–223.

Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., and Yaros, M.J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37, 646–650.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Coombs, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J.P., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., et al. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387–397.

Lianidou, E.S., Mavroudis, D., Sotiropoulou, G., Agelaki, S., and Pantel, K. (2010). What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Res. BCR* 12, 307.

Link-Lenczowska, D., Pallisgaard, N., Cordua, S., Zawada, M., Czekalska, S., Krochmalczyk, D., Kandała, Z., and Sacha, T. (2018). A comparison of qPCR and ddPCR used for quantification of the JAK2 V617F allele burden in Ph negative MPNs. *Ann. Hematol.*

Lion, T., Henn, T., Gaiger, A., Kalhs, P., and Gadner, H. (1993). Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Lancet Lond. Engl.* 341, 275–276.

Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J.C., Behnia, K., Castaneda, S., Cornelius, L.A.M., Das, J., Doneyko, A.M., et al. (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-

(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* *47*, 6658–6661.

Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., et al. (2014). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* *123*, 2220–2228.

Maier, J., Lange, T., Kerle, I., Specht, K., Bruegel, M., Wickenhauser, C., Jost, P., Niederwieser, D., Peschel, C., Duyster, J., et al. (2013). Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 4854–4867.

Mandel, P., and Metais, P. (1948). [Not Available]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* *142*, 241–243.

Manicone, M., Scaini, M.C., Rodriquenz, M.G., Facchinetti, A., Tartarone, A., Aieta, M., Zamarchi, R., and Rossi, E. (2017). Liquid biopsy for monitoring anaplastic lymphoma kinase inhibitors in non-small cell lung cancer: two cases compared. *J. Thorac. Dis.* *9*, S1391–S1396.

Markert, E., Siebolts, U., Odenthal, M., Kreuzer, K.-A., and Wickenhauser, C. (2009). High diagnostic value of morphologic examination and molecular analysis of bone marrow biopsies in a case of BCR-ABL+ CML with clusters of blasts. *Int. J. Hematol.* *89*, 294–297.

Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J.-L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., et al. (2016). Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* *127*, 1317–1324.

Maru, Y., and Witte, O.N. (1991). The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* *67*, 459–468.

McKerrell, T., Park, N., Moreno, T., Grove, C.S., Ponstingl, H., Stephens, J., Understanding Society Scientific Group, Crawley, C., Craig, J., Scott, M.A., et al. (2015). Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* *10*, 1239–1245.

Melzner, I., Weniger, M.A., Menz, C.K., and Möller, P. (2006). Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* *20*, 157–158.

Moeller, M., Siebolts, U., Wickenhauser, C., and Schuette, W. (2018). [Non-Small Cell Lung Cancer - Development of Parallel Mechanisms of Resistance]. *Pneumol. Stuttg. Ger.* *72*, 503–506.

Mouliere, F., Robert, B., Arnau Peyrotte, E., Del Rio, M., Ychou, M., Molina, F., Gongora, C., and Thierry, A.R. (2011). High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* *6*, e23418.

- Neumann, J.H.L., Jung, A., and Kirchner, T. (2015). [Molecular pathology of colorectal cancer]. *Pathol.* *36*, 137–144.
- Nishii, K., Nanbu, R., Lorenzo V, F., Monma, F., Kato, K., Ryuu, H., and Katayama, N. (2007). Expression of the JAK2 V617F mutation is not found in de novo AML and MDS but is detected in MDS-derived leukemia of megakaryoblastic nature. *Leukemia* *21*, 1337–1338.
- Nowell, P., and Hungerford, D. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* *132*, 1497.
- Odenthal, M., Siebolts, U., Ernestus, K., Disse, D., Dienes, H.P., and Wickenhauser, C. (2008). Immunoglobulin heavy chain gene analysis in bone marrow biopsies and corresponding lymph node specimens: dependency on pre-treatment, histological subtype and extension of B-cell lymphoma. *Int. J. Mol. Med.* *21*, 569–576.
- Pasquier, F., Cabagnols, X., Secardin, L., Plo, I., and Vainchenker, W. (2014). Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* *14 Suppl*, S23-35.
- Passamonti, F., Mora, B., and Maffioli, M. (2016). New molecular genetics in the diagnosis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Curr. Opin. Hematol.* *23*, 137–143.
- Patel, A.B., O’Hare, T., and Deininger, M.W. (2017). Mechanisms of Resistance to ABL Kinase Inhibition in Chronic Myeloid Leukemia and the Development of Next Generation ABL Kinase Inhibitors. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *31*, 589–612.
- Perricone, M., Palandri, F., Ottaviani, E., Angelini, M., Bagli, L., Bellesia, E., Donati, M., Gemmati, D., Zucchini, P., Mancini, S., et al. (2017). Assessment of the interlaboratory variability and robustness of JAK2V617F mutation assays: A study involving a consortium of 19 Italian laboratories. *Oncotarget* *8*, 32608–32617.
- Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* *3*, e270.
- Radich, J.P. (2009). How I monitor residual disease in chronic myeloid leukemia. *Blood* *114*, 3376–3381.
- Radich, J.P., and Mauro, M.J. (2017). Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *31*, 577–587.
- Radich, J.P., Gehly, G., Gooley, T., Bryant, E., Clift, R.A., Collins, S., Edmands, S., Kirk, J., Lee, A., and Kessler, P. (1995). Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood* *85*, 2632–2638.
- Rampal, R., Ahn, J., Abdel-Wahab, O., Nahas, M., Wang, K., Lipson, D., Otto, G.A., Yelensky, R., Hricik, T., McKenney, A.S., et al. (2014). Genomic and functional analysis of leukemic

transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E5401-5410.

Rehfeld, C., Münz, S., Krogdahl, A., Jensen, E.M.P., Siebolts, U., Ferraz, C., Bösenberg, E., Hegedüs, L., Paschke, R., and Eszlinger, M. (2013). Impact of different methodologies on the detection of point mutations in routine air-dried fine needle aspiration (FNA) smears. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *45*, 513–517.

Riede, U., and Werner, M. (2017). *Allgemeine und Spezielle Pathologie* (Springer).

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* *348*, 124–128.

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., and Nyrén, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* *242*, 84–89.

Ronaghi, M., Uhlén, M., and Nyrén, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* *281*, 363, 365.

Ross, J.S., Schenkein, D.P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G.P., Stec, J., Stagliano, N.E., Ginsburg, G.S., Symmans, W.F., Pusztai, L., et al. (2004). Targeted therapies for cancer 2004. *Am. J. Clin. Pathol.* *122*, 598–609.

Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., Pacilli, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Fanelli, T., Bosi, A., Vannucchi, A.M., and Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators (2014). Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* *123*, 1552–1555.

Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., et al. (2014). JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* *123*, 1544–1551.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnol. Read. Mass* *24*, 104–108.

Schmiegel, W., and Pox, C. (2017). *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0*.

Schmitt, K., and Brümmendorf, T.H. (2016). Die chronische myeloische Leukämie (CML) im Zeitalter der Tyrosinkinase-Inhibitor-Therapie. *Arzneimitteltherapie* 3–12.

Schönherr, M., Bhattacharya, A., Kottek, T., Szymczak, S., Köberle, M., Wickenhauser, C., Siebolts, U., Saalbach, A., Koczan, D., Magin, T.M., et al. (2014). Genomewide RNAi screen identifies protein kinase C β and new members of mitogen-activated protein kinase pathway as regulators of melanoma cell growth and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* *27*, 418–430.

- Schreuders, E.H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R.E., Sung, J.J.Y., Young, G.P., and Kuipers, E.J. (2015). Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. *Gut* *64*, 1637–1649.
- Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., et al. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* *356*, 459–468.
- Shammaa, D., Bazarbachi, A., Halas, H., Greige, L., and Mahfouz, R. (2010). JAK2 V617F mutation detection: laboratory comparison of two kits using RFLP and qPCR. *Genet. Test. Mol. Biomark.* *14*, 13–15.
- Shammo, J.M., and Stein, B.L. (2016). Mutations in MPNs: prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decisions. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* *2016*, 552–560.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., and Canaani, E. (1985). Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* *315*, 550–554.
- Siebolts, U., Ates, M., Spitz, R., Thiele, J., and Wickenhauser, C. (2005). Quantification of clonal hematopoiesis in polycythemia vera. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *447*, 947–953.
- Siebolts, U., Thiele, J., Zander, T., Ditschkowski, M., Beelen, D.W., Kröger, N., Fehse, B., and Wickenhauser, C. (2008). Differences in proportion and dynamics of recipient hematopoiesis following hematopoietic cell transplantation in CML and IMF. *Oncol. Rep.* *19*, 287–292.
- Siebolts, U., Breuhahn, K., Hennecke, A., Schultze, J.L., and Wickenhauser, C. (2009a). Imbalance of DNA-dependent protein kinase subunits in polycythemia vera peripheral blood stem cells. *Int. J. Cancer* *124*, 600–607.
- Siebolts, U., Varnholt, H., Drebber, U., Dienes, H.-P., Wickenhauser, C., and Odenthal, M. (2009b). Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J. Clin. Pathol.* *62*, 84–88.
- Siebolts, U., Lange, T., Niederwieser, D., and Wickenhauser, C. (2010). Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy. *J. Clin. Pathol.* *63*, 370–372.
- Siebolts, U., Haller, F., and Laßmann, S. (2018). DGP brems hohe Erwartungen nach US-Studie zu “Liquid Biopsy.”
- Siravegna, G., and Bardelli, A. (2016). Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mol. Oncol.* *10*, 475–480.
- Snover, D.C. (2011). Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* *42*, 1–10.
- Sorrells, R.B. (1974). Synovioanalysis (“liquid biopsy”). *J. Ark. Med. Soc.* *71*, 59–62.

- Staerk, J., Kallin, A., Royer, Y., Diaconu, C.C., Dusa, A., Demoulin, J.-B., Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2007). JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol. Biol. (Paris)* 55, 88–91.
- Steensma, D.P. (2018). Clinical Implications of Clonal Hematopoiesis. *Mayo Clin. Proc.* 93, 1122–1130.
- Stegelmann, F., Bullinger, L., Griesshammer, M., Holzmann, K., Habdank, M., Kuhn, S., Maile, C., Schauer, S., Döhner, H., and Döhner, K. (2010). High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica* 95, 666–669.
- Stegelmann, F., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Paschka, P., Griesshammer, M., Blersch, C., Kuhn, S., Schauer, S., Döhner, H., and Döhner, K. (2011). DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 25, 1217–1219.
- Stenzinger, A., Endris, V., Pfarr, N., Andrulis, M., Jöhrens, K., Klauschen, F., Siebolts, U., Wolf, T., Koch, P.-S., Schulz, M., et al. (2014). Targeted ultra-deep sequencing reveals recurrent and mutually exclusive mutations of cancer genes in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Oncotarget* 5, 6404–6413.
- Swerdlow, S., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J. (2008). World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France: IARC Press).
- Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., Arber, D.A., Hasserjian, R., Le Beau, M.M., et al. (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France: IARC Press).
- Szpurka, H., Tiu, R., Murugesan, G., Aboudola, S., Hsi, E.D., Theil, K.S., Sekeres, M.A., and Maciejewski, J.P. (2006). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 108, 2173–2181.
- Tabayoyong, W., and Abouassaly, R. (2015). Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surg. Clin. North Am.* 95, 1023–1039.
- Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., et al. (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 354, 2531–2541.
- Tefferi, A. (2007). JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms. *Cancer J. Sudbury Mass* 13, 366–371.
- Tefferi, A., and Vannucchi, A.M. (2017). Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms. *Mayo Clin. Proc.* 92, 1283–1290.

- Tefferi, A., and Vardiman, J.W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14–22.
- Tefferi, A., Lasho, T.L., Tischer, A., Wassie, E.A., Finke, C.M., Belachew, A.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A.D. (2014). The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood* 124, 2465–2466.
- Tefferi, A., Nicolosi, M., Mudireddy, M., Szuber, N., Finke, C.M., Lasho, T.L., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., Gangat, N., et al. (2017). Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am. J. Hematol.*
- Thiele, J., Varus, E., Siebolts, U., Kvasnicka, H.M., Wickenhauser, C., Metz, K.A., Beelen, D.W., Ditschkowski, M., Zander, A., and Kröger, N. (2007). Dualism of mixed chimerism between hematopoiesis and stroma in chronic idiopathic myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Histol. Histopathol.* 22, 365–372.
- Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H.-L., Christie, M., et al. (2016). Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* 8, 346ra92.
- Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., and Skoda, R.C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111, 3931–3940.
- Ukena, D., and Schönfeld, N. (2018). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0.
- Utermöhlen, O., Baschuk, N., Abdullah, Z., Engelmann, A., Siebolts, U., Wickenhauser, C., Stocking, C., and Krönke, M. (2009). Immunologic hurdles of therapeutic stem cell transplantation. *Biol. Chem.* 390, 977–983.
- Vainchenker, W., and Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 129, 667–679.
- Vannucchi, A.M., and Guglielmelli, P. (2008). Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica* 93, 972–976.
- Vannucchi, A.M., and Harrison, C.N. (2017). Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 129, 693–703.
- Vardiman, J., and Harris, N. (2001). WHO histological classification of chronic myeloproliferative diseases. In *World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, (Lyon, France: IARC Press), pp. 17–44.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World

Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* *114*, 937–951.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* *319*, 525–532.

Vogiatzi, F., Brandt, D.T., Schneikert, J., Fuchs, J., Grikscheit, K., Wanzel, M., Pavlakis, E., Charles, J.P., Timofeev, O., Nist, A., et al. (2016). Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E8433–E8442.

Volckmar, A.-L., Leichsenring, J., Flechtenmacher, C., Pfarr, N., Siebolts, U., Kirchner, M., Budczies, J., Bockmayr, M., Ridinger, K., Lorenz, K., et al. (2017). Tubular, lactating, and ductal adenomas are devoid of MED12 Exon2 mutations, and ductal adenomas show recurrent mutations in GNAS and the PI3K-AKT pathway. *Genes. Chromosomes Cancer* *56*, 11–17.

Wickenhauser, C., Pérez, F., Siebolts, U., Lorenzen, J., Varus, E., Frimpong, S., and Thiele, J. (2003). Structural, antigenetic and transcriptional characteristics in peripheral blood CD34+ progenitor cells from polycythemia vera patients: evidence for delayed determination. *Int. J. Oncol.* *23*, 437–443.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* *284*, 555–556.

Yang, Y., Akada, H., Nath, D., Hutchison, R.E., and Mohi, G. (2016). Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood* *127*, 3410–3423.

Zecca, M., Bergamaschi, G., Kratz, C., Bergsträsser, E., Danesino, C., De Filippi, P., Hasle, H., Lisini, D., Locatelli, F., Pession, A., et al. (2007). JAK2 V617F mutation is a rare event in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* *21*, 367–369.

Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., and Zhao, Z.J. (2005). Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.* *280*, 22788–22792.

Zwanziger, D., Badziong, J., Ting, S., Moeller, L.C., Schmid, K.W., Siebolts, U., Wickenhauser, C., Dralle, H., and Fuehrer, D. (2015). The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr. Relat. Cancer* *22*, 819–830.

4. Thesen

Progenitorzellen der Polyzythämia vera sind als neoplastische Zellen erkennbar durch höhere Größenvarianz der Zellen, Vermehrung der Mitochondrienanzahl, Vergrößerung der Golgi-Apparate und Dysregulation von Wachstumsrezeptoren.

Es existiert eine nicht- neoplastische Zellfraktion im Blut von Patienten mit Polyzythämia vera als mögliches Reservoir einer gezielten Therapie.

Die Akkumulation chromosomaler Schäden von Progenitorzellen von Patienten mit Polyzythämia vera ist verursacht durch eine aberrante Expression der DNA-abhängigen Proteinkinaseuntereinheit *KU86*.

Trotz vollständiger Spenderhämatopoiese im Blut von Patienten mit primärer Myelofibrose bei Zustand nach allogener Stammzelltransplantation mit dosisreduzierter Konditionierung existiert im Knochenmark eine langsam rückläufige Zahl an neoplastischen Progenitorzellen.

Die schlechtere Prognose von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie bei Zustand nach Therapie mit allogener Stammzelltransplantation und dosisreduzierter Konditionierung ist bedingt durch eine höhere Anzahl einer verbleibenden neoplastischen Progenitorzellpopulation im Knochenmark verglichen mit gleichartig behandelten Patienten mit primärer Myelofibrose.

Mittels vergleichender Untersuchungen tumorassoziierter Mutationen lassen sich Informationen zur therapieassozierten Tumorevolution zur Resistenzentwicklung gewinnen.

Beim serösen Borderlinetumor des Ovars handelt es sich um eine neoplastische Tumorerkrankung mit dem Potential einer peritonealen und lymphonodalen Metastasierung.

Die vergleichende Klonalitätsanalyse bei lymphoproliferativen Neoplasien bietet die Möglichkeit einer prognostischen Aussage im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik.

Formalinfixiertes und paraffiniertes Gewebe ist für quantitative microRNA Expressionsanalysen auch nach Jahren der Archivierung geeignet.

Ein technisch hochempfindliches Verfahren zur Detektion der aktivierenden *JAK2* p.V617F Mutation ermöglicht eine posttherapeutische prognostische Stratifizierung von Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung sowie ein Monitoring eines molekularen Frührezidivs.

5. Publikationen

Original Article

Monoclonal Origin of Peritoneal Implants and Lymph Node Deposits in Serous Borderline Ovarian Tumors (s-BOT) With High Intratumoral Homogeneity

Lars-Christian Horn, M.D., Ph.D., Anne K. Höhn, M.D., Jens Einenkel, M.D.,
and Udo Siebolts, M.D., Ph.D.

Summary: Molecular studies have shown that the most prevalent mutations in serous ovarian borderline tumors (s-BOT) are *BRAF* and/or *KRAS* alterations. About one third of s-BOT represent peritoneal implants and/or lymph node involvement. These extraovarian deposits may be monoclonal or polyclonal in origin. To test both the hypotheses, mutational analyses using pyrosequencing for *BRAF* codon 600 and *KRAS* codon 12/13 and 61 of microdissected tissue was performed in 15 s-BOT and their invasive and noninvasive peritoneal implants. Two to 6 implants from different peritoneal sites were examined in 13 cases. Lymph node deposits were available for the analysis in 3 cases. Six s-BOT showed mutation in exon 2 codon 12 of the *KRAS* proto-oncogen. Five additional cases showed *BRAF* p.V600E mutation representing an overall mutation rate of 73.3%. Multiple (2–6) peritoneal implants were analyzed after microdissection in 13 of 15 cases. All showed identical mutational results when compared with the ovarian site of the disease. All lymph node deposits, including those with multiple deposits in different nodes, showed identical results, suggesting high intratumoral mutational homogeneity. The evidence presented in this study and the majority of data reported in the literature support the hypothesis that s-BOT with their peritoneal implants and lymph node deposits show identical mutational status of *BRAF* and *KRAS* suggesting a monoclonal rather than a polyclonal disease regarding these both tested genetic loci. In addition, a high intratumoral genetic homogeneity can be suggested. In conclusion, the results of the present study support the monoclonal origin of s-BOT and their peritoneal implants and lymph node deposits. **Key Words:** *BRAF*—*KRAS*—Serous borderline tumor—Ovary—Clonality—Implant—Lymph node—Mutation.

From the Institute of Pathology (L.-C.H., A.K.H.), Division of Breast, Gynecologic & Perinatal Pathology; Department of Obstetrics and Gynecology (J.E.), Institute of Trier; and Institute of Pathology (U.S.), Division Molecular Pathology, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

L.-C.H. and A.K.H. contributed equally.

The authors declare no conflict of interest.

Address Correspondence and Reprints to Lars-Christian Horn, MD, PhD, Institute of Pathology, Division of Breast, Gynecologic & Perinatal Pathology, University of Leipzig, Liebigstrasse 26, Leipzig D-04103, Germany. E-mail: hornl@medizin.uni-leipzig.de.

Clinical epidemiological, histologic, and molecular studies have shown that ovarian cancer can no longer be considered as a single disease. A dualistic model of ovarian carcinogenesis has been proposed during the last few years that classifies (serous) carcinomas into 2 groups (1–5): the high-grade serous cancer, the prototype of Type II ovarian cancer, is characterized by high frequency (~90% of all serous ovarian cancer), rapid progressive and mostly lethal disease,

Udo Siebolts · Murat Ates · Rüdiger Spitz ·
Jürgen Thiele · Claudia Wickenhauser

Quantification of clonal hematopoiesis in polycythemia vera

Received: 23 June 2005 / Accepted: 3 July 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Polycythemia vera (PV) is believed to represent a clonal trilineage myeloaccumulative hematopoietic disorder. This study was undertaken to estimate for the first time the proportion not only of the neoplastic clone but also of clonal and residual nonneoplastic CD34⁺ progenitor cells. Chromosomal abnormalities, including trisomy 8 or 9, are phenomena associated in about 20% of PV patients. Therefore, we screened peripheral blood (PB) mononuclear cells of PV patients in the chronic phase of the disease and looked for chromosomal abnormalities performing comparative genomic hybridization. Two of the ten patients revealed cytogenetic changes, including trisomy 8 or 9. To quantify the proportion of cytogenetic abnormal cells in these patients, we applied fluorescence in situ hybridization (FISH) technique on immunomagnetically enriched cell fractions. Ninety percent of the mononuclear cells and up to 79% of PB-derived CD34⁺ progenitor cells presented three signals for chromosome 8 or 9. The diagnostic value of FISH to detect trisomies in trephine biopsies was then tested in all patients under study. Although the probability to detect FISH signals in a certain section plane is reduced, constantly 10–15% of the cells revealed three signals. Concerning the CD34⁺ progenitor cell pool, a distinct nonclonal population exists in these patients. Our data underline the stem cell character of PV and additionally quantify the proportion of clonal CD34⁺ progenitor cells for the first time. The finding of a distinct, not aberrant, CD34⁺ progenitor cell population in chronic phase PV may

offer perspectives in treatment of the disease. Finally, FISH analysis of bone marrow biopsies can be helpful to consolidate diagnosis of early PV.

Keywords Polycythemia vera · Chromosomal aberrations · CD34⁺ · FISH · CGH

Introduction

Polycythemia vera (PV) is believed to be a clonal disorder arising in a multipotent hematopoietic progenitor cell that causes the accumulation of morphologically normal red cells, white cells, platelets, and their precursors in the absence of a definable stimulus [26]. However, the molecular basis of PV remains elusive. The hallmark of the disease is trilineage hematopoietic proliferation (panmyelosis) dominated by erythropoiesis [26]. Therefore, most investigations on the pathogenesis of PV have focused on the red cell lineage. Indeed, a peculiarity of PV patients is the reduced serum erythropoietin (Epo) level [6]. The results concerning functional aspects of the erythropoiesis in PV, however, are contradictory. PV erythroid progenitor cells are able to proliferate in vitro in the absence of Epo, but this does not define the limits of the abnormal clone since not all PV erythroid progenitor cells exhibit Epo independence [7]. The existence of several hematologic subpopulations in PV may therefore be speculated, and a quiescent significant proportion of nonneoplastic cells in blood and bone marrow of PV patients cannot be excluded. In several recently published studies, the hypersensitivity of PV progenitors to several growth factors was explained by a point mutation of Janus kinase 2 gene (JAK2), leading to a constitutive activation of this downstream transducer of growth-factor-induced signaling [2, 14, 21]. This point mutation, however, was also seen in other chronic myeloproliferative disorders and, therefore, is not specific for PV.

Although there is no pathognomonic chromosomal abnormality defining PV, consistent, acquired cytogenetic changes, including del(20q), del(13q), trisomies 8 and 9 as well as duplication of 1q, have been observed at diagnosis

U. Siebolts · M. Ates · J. Thiele · C. Wickenhauser (✉)
Institute of Pathology, University of Cologne,
Joseph-Stelzmannstr. 9,
50924 Cologne, Germany
e-mail: c.wickenhauser@uni-koeln.de
Tel.: +49-221-4786368
Fax: +49-221-4786360

R. Spitz
Children's Hospital, Pediatric Oncology,
University of Cologne,
Cologne, Germany

Differences in proportion and dynamics of recipient hematopoiesis following hematopoietic cell transplantation in CML and IMF

UDO SIEBOLTS^{1,5}, JÜRGEN THIELE¹, THOMAS ZANDER⁴, MARKUS DITSCHKOWSKI³,
DIETRICH W. BEELEN³, NICOLAUS KRÖGER², BORIS FEHSE² and CLAUDIA WICKENHAUSER¹

¹Institute of Pathology, University of Cologne, Kerpener Str. 62, D-50924 Cologne; ²Department of Bone Marrow Transplantation, University Hospital Hamburg, D-20246 Hamburg; ³Department of Bone Marrow Transplantation, University Hospital of Essen, Hufeland Str. 55, D-45122 Essen; ⁴Molecular Tumor Biology and Tumor Immunology, Clinic I for Internal Medicine, University of Cologne; ⁵Center for Molecular Medicine, University of Cologne (CMMC), Kerpener Str. 62, D-50924 Cologne, Germany

Received August 16, 2007; Accepted September 26, 2007

Abstract. Since decades myeloablation followed by allogeneic stem cell transplantation offered the only opportunity to cure leukemia patients and only recently the development of STI571 created a further alternative in chronic myeloid leukemia (CML). While among all leukemias this transplantation regimen had the best outcome in CML, trials with reduced intensity conditioning regimens (RIC) were rather humbling and recurrence of the neoplastic clone occurred frequently. However, the same therapy in patients with idiopathic myelofibrosis (IMF) resulted in a more favorable outcome. Therefore, long-term mixed chimerism (mCh) was determined on bone marrow (BM) biopsies derived from five IMF patients and from eight CML patients of the pre STI era following sex-mismatched transplantation. All patients presented lasting hematologic remission and were matched concerning age, sex and appearance of GvHD. Analysis of late transplant period (day +100) revealed a concentration of host cells within the CD34⁺ precursor cell compartment in both diseases. However, in IMF BM biopsies only up to 8% recipient CD34⁺ precursors but in CML biopsies up to 26% recipient CD34⁺ precursors were detected. Taken into account that in CML up to 10% of the host BM CD34⁺ precursors bear the BCR-ABL translocation our data suggest that the neoplastic CD34⁺ progenitor cell population might dispose of better strategies to escape immune surveillance in CML than in IMF.

Introduction

Allogeneic bone marrow and hematopoietic stem cell transplantation (allo-BMT/HSCT) has arguably been applied successful in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) and still remains the most effective strategy for inducing durable molecular remission in STI571 (imatinib mesylate, Gleevec) refractory patients (1,2). The application of conventional myeloablative allo-HSCT has, amongst others, been limited by the age of the recipient. Therefore, the use of reduced intensity conditioning (RIC) regimen was studied in a limited number of patients. However, even if some published data remain contradictory most studies reported an elevated risk for recurrence of the disease and an adverse outcome (1,3,4). Idiopathic myelofibrosis (IMF), a less common chronic myeloproliferative disease (CMPD) with an onset in the elderly, carries a prognosis with a median survival of four years (5,6). Initial studies on a small number of patients demonstrated that conventional myeloablative therapy lead to high transplant-related mortality (7-10). However, the use of RIC resulted in a better outcome in IMF patients (11). In general, the elimination of tumor cells is mostly due to a strong graft-versus-leukemia (GVL) effect of the donor alloimmune effector lymphocytes (12-14). When leukemia relapses after allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT), donor lymphocyte transfusions can induce sustained remissions in some patients (15). The different response of IMF and CML patients on above-mentioned therapy regimen could suggest that neoplastic hematopoiesis in CML might dispose of better escape strategies than hematopoiesis in IMF.

Correspondence to: Dr Claudia Wickenhauser, Institute of Pathology, University of Cologne, Kerpener Str. 62, D-50924 Cologne, Germany

E-mail: c.wickenhauser@uni-koeln.de

Key words: chronic myeloproliferative disease, chronic myeloid leukemia, reduced intensity conditioning, graft-versus-leukemia, mixed chimerism, FISH, CD34⁺ progenitors

Patients and methods

Patients (IMF). A total of five patients (four men, one woman; mean age 45 years, fifteen sequential post-transplant trephine biopsies) with IMF in the chronic phase of the disease received PBSC grafts from sex-mismatched HLA identical family

Immunoglobulin heavy chain gene analysis in bone marrow biopsies and corresponding lymph node specimens: Dependency on pre-treatment, histological subtype and extension of B-cell lymphoma

MARGARETE ODENTHAL^{1*}, UDO SIEBOLTS^{1,2*}, KAREN ERNESTUS¹, DANIEL DISSE¹, HANS PETER DIENES¹ and CLAUDIA WICKENHAUSER¹

¹Institute of Pathology, ²Center for Molecular Medicine (CMMC), University of Cologne, Kerpener Str. 62, D-50924 Cologne, Germany

Received October 17, 2007; Accepted December 14, 2007

Abstract. Bone marrow biopsies (BMB) are the conventional staging method for assessing marrow involvement by lymphoma. Morphological criteria provide basic data determining their dignity, but concerning microfocal infiltrates, these criteria are rather inaccurate. Here, by examination of immunoglobulin H (IgH) receptor rearrangement and comparison of medullar and nodular lymphoma sites, diagnostic reliability was improved. Employing non-nested IgH rearrangement analysis with FR3A and JHa consensus primers, B-cell clonality was assessed on glutardialdehyde fixed, decalcified BMB with and without lymphoma infiltration and on the corresponding lymph node specimens. Malignancy was confirmed when polymerase chain reaction (PCR) generated no more than two peaks and was observed in 60% of the medullar B-cell lymphoma. Comparison of lymph node tissues and BMB revealed an identical pattern in 50% of the probes. In 25% of the cases a single clonal peak derived from the lymph node tissues was also observed in the BMB but was surrounded by additional peaks. Here, direct comparison of the data permitted determination of lymphoma in the BMB. Therefore, IgH FR3 PCR analysis is a suitable tool to examine small lymphoid infiltrates in BMB, and direct comparison with corresponding nodal lymphoma can further facilitate estimation of their dignity.

Introduction

There are still conflicting opinions over the distinction between benign (reactive) focal lymphoid aggregates and focal infiltrates of malignant lymphomas in BMB (1-4). Although in BMB particularly histotopography and cytomorphology of lymphoid infiltrates and an increase in reticulin fibers may lead to a certain suspicion concerning their dignity, the morphological evaluation lacks diagnostic reliability particularly concerning microfocal infiltrates and biopsies with inferior quality (5). In daily routine diagnostics, however, the hematopathologist is frequently confronted with this differential diagnosis especially with respect to lymphoma staging, as well as for assessing treatment response and/or restaging. In addition, in lymphoproliferative diseases without LN involvement, diagnosis can only be ascertained in suitable BMB.

IgH FR3 PCR analysis has already been used by others to check clonality of lymphoid infiltrates in BMB (6-12). However, until now the support of corresponding LN clonality analysis in diagnosis of BM involvement has not been investigated systematically. Therefore, in this retrospective study we evaluated the impact of this assay on glutardialdehyde (GA)-fixed, decalcified BMB especially with regard to small medullar lymphoid infiltrates. Data were then compared with those obtained from corresponding lymphoma-infiltrated LN tissues, and this assay facilitated the interpretation of BMB-derived data. When the histomorphology of the BMB was compared with the clonality data, peritrabecular position and increase of reticular fibers were the most significant features indicating malignancy. Prerequisites for a high quality hematological diagnosis therefore incorporate the optimal histological processing of BMB, IgH rearrangement analysis and, ideally, comparison of nodal and medullar lymphoma sites.

Materials and methods

Tissue samples. Paraffin wax-embedded specimens of BMB and LN tissue were analyzed from a total of 40 patients

Correspondence to: Dr Claudia Wickenhauser, Institute of Pathology, University of Cologne, Kerpener Str. 62, D-50924 Cologne, Germany
E-mail: c.wickenhauser@uni-koeln.de

*Contributed equally

Key words: lymphoma, immunoglobulin H receptor rearrangement, bone marrow biopsy

Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR

U Siebolts,^{1,2} H Varnholt,¹ U Drebber,¹ H-P Dienes,¹ C Wickenhauser,¹ M Odenthal¹

¹Institute of Pathology, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany; ²Center for Molecular Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany

Correspondence to: Margarete Odenthal, Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Kerpener Straße 62, 50924 Cologne, Germany; m.odenthal@uni-koeln.de

US and HV contributed equally to this work.

Accepted 12 August 2008
Published Online First
28 August 2008

ABSTRACT

Background: MicroRNAs have recently taken centre stage as short non-coding RNAs that regulate mRNA expression.

Aim/Methods: To assess the feasibility of using microRNA techniques on routinely processed tissues, the accessibility of two representative microRNAs was examined by real-time quantitative PCR in 86 human formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from liver, breast, bone marrow, lymphatic tissues and colon. Murine liver was used to analyse the influence of fixation time and different fixatives.

Results: High-quality microRNA was successfully extracted from routinely processed formalin-fixed tissues, resembling PCR amplification results from snap-frozen material analysed in parallel. While fixation time did not affect microRNA accessibility, non-buffered formalin or fixative supplements such as glutaraldehyde influenced PCR results. Storage of human tissues for up to 7 years did not cause a significant deterioration of microRNA. However, microRNA quality in human archival material following routine processing 10–20 years ago was decreased. Oxidation by ambient air during storage and fixation in non-buffered formalin is a possible reason for loss of microRNA quality.

Conclusion: The assessment of microRNAs in readily obtained formalin-fixed paraffin-embedded samples is a highly promising tool in molecular pathology when similarly treated samples are analysed. Therefore, microRNA analyses will gain wider acceptance as an adjunct to morphological tissue assessment in routine pathology and retrospective studies.

Extraordinary progress in molecular pathology has been made during the last 10 years, and molecular pathology techniques are moving rapidly from the research bench to routine utilisation in diagnostic pathology. Many molecular RNA-based techniques suffer from challenges when routinely processed tissues, which have passed through fixation and embedding steps, are utilised.^{1–9} Commonly used formaldehyde-containing fixatives cause cross-linkage between nucleic acids and proteins, making subsequent extraction and quantification of RNA challenging.^{4–6} One advantage of PCR technologies is that they do not require high amounts of target molecules.⁷ However, a major obstacle to RNA expression fingerprinting of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues has been the uncertainty about whether gene expression analyses from routinely archived tissues accurately reflect the expression before fixation⁸ because of poor quality due to high fragmentation by tissue processing.⁹ Since fragmentation does not cause further loss of quality when naturally occurring

small RNAs are targeted, microRNA (miRNA) might be ideal to be analysed by PCR in molecular pathology applications. The recently discovered miRNAs are non-coding RNAs that are not longer than 22 bases in mature size and play a crucial regulatory role in organ development, tumorigenesis and chronic disease.^{10–16} miRNA expression profiling of human tumours has already identified signatures associated with diagnosis, progression, prognosis and response to treatment,^{11–16} but most of these studies have used cell culture material or snap-frozen tissue from rodents or humans.^{17–19} Although a number of authors have shown that routinely processed FFPE tissue is suitable for real-time quantitative PCR studies as long as the amplicon sizes are shorter than 200 nucleotides and normalisation to one or several housekeeping genes is accomplished,^{5–8–9–20–21} there are only a few detailed studies about the feasibility of PCR assays from FFPE tissues for non-coding short RNAs.^{22–24} FFPE tissue samples have been collected throughout decades of routine histopathological examination and are thus the most widely available material in tissue archives around the world.^{4–9} Thus, if miRNAs could be analysed in FFPE material, miRNAs could gain wider acceptance as molecular markers in retrospective studies of large tissue cohorts and as general diagnostic and scientific tools. To our knowledge, no study has systematically assessed the effects of formalin fixation from 12 h onward, the effects of tissue storage for more than 25 years, or the effects of miRNA expression in a variety of human tissues across the spectrum from highly adipose breast parenchyma to cellular liver parenchyma and decalcified bone marrow specimens.

The aims of this study are twofold: to demonstrate the effects of fixatives and prolonged storage in paraffin blocks on accessibility of two representative miRNAs and to show the suitability of routine FFPE tissue for comprehensive miRNA expression analyses using real-time PCR.

MATERIAL AND METHODS

Human snap-frozen and FFPE specimens

All specimens were obtained from the tumour bank or from the archive of paraffin-embedded diagnostic tissues of the Institute for Pathology at the University Hospital of Cologne, Germany, 1980–2007, and were used in accordance with the policies of the institutional review board of the hospital.

Eighty-eight FFPE samples from different organs, patients and diagnoses as well as matched snap-frozen tissue from liver (n = 4) and colon (n = 3) were selected (table 1).



This paper is freely available online under the BMJ Journals unlocked scheme, see <http://jcp.bmj.com/info/unlocked.dtl>

Imbalance of DNA-dependent protein kinase subunits in polycythemia vera peripheral blood stem cells

Udo Siebolts^{1,2,3*}, Kai Breuhahn⁴, Andrea Hennecke¹, Joachim L. Schultze^{2,5} and Claudia Wickenhauser^{1,3}

¹Institute of Pathology, University of Cologne, Cologne, Germany

²Center for Molecular Medicine, University of Cologne (CMC), Cologne, Germany

³Institute of Pathology, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

⁴Institute of Pathology, University Hospital Heidelberg, Molecular Hepatopathology, Im Neuenheimer Feld, Heidelberg, Germany

⁵Molecular Tumor Biology and Tumor Immunology, Center for Internal Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany

Polycythemia vera (PV) is a clonal hematopoietic stem cell disease characterized by a trilinear accumulation of blood cells that has been recently associated with a *JAK2*^{V617F} point mutation. However, this molecular defect represents a rather late event in the disease progression, is not specific for this disease, and is not ascertained in all patients indicating that additional factors contribute to the specific phenotype of PV. Therefore, cDNA microarray analyses were performed on CD34⁺ peripheral blood stem cells (PBSC) with subsequent evaluation on mRNA and protein level of a larger cohort of PV patients. Microarray analyses revealed a significant dysregulation of 11 genes. *KU86*, a gene coding for a subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), displayed the strongest upregulation in all patients under study. This peculiarity was accompanied by downregulation of the catalytic DNA-PK subunit *DNA-PKcs*. Also *Ku86* protein was upregulated and expressed in the vast majority of CD34⁺ PBSC nuclei while a weak nuclear expression was detected in only one blood donor. Differential expression of several genes, imbalance of the distinct subunits of DNA-PK, and particularly the strong upregulation of *Ku86* protein, are new findings in PV CD34⁺ PBSC. These factors may contribute to the accumulation of chromosomal aberrations, accumulation of hematopoietic cells (especially of erythropoiesis), and prolongation of CD34⁺ PBSC life span observed in PV.

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: polycythemia vera; CD34⁺; gene signature; DNA-PK; *KU86*

Chronic myeloproliferative disorders are characterized by abnormal accumulation of more than one hematopoietic lineage associated with relatively normal maturation.¹ Amongst these polycythemia vera (PV) is an acquired clonal myeloaccumulative disease (panmyelosis) with increased red cell production independent of mechanisms that normally regulate erythropoiesis.² An acquired and activating *JAK2*^{V617F} point mutation was previously described occurring in most patients suffering from this disease.^{3–7} However, it has to be taken into account that this point mutation is not specific for PV and that 3–36% of PV patients are *JAK2*^{V617F} negative.^{3,6} In addition, Kralovics *et al.* were able to demonstrate that *JAK2*^{V617F} represents a rather late event in disease progression.^{8,9} Therefore, other molecular defects within the stem cell compartment have to be responsible for the specific phenotype of PV.

On this account, we analyzed gene regulation of CD34⁺ peripheral blood stem cells (PBSC) from PV patients and healthy blood donors. The most prominent elevated gene was *KU86*, a subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). As a multifunctional protein *Ku86* has been implicated in the regulation of many pivotal nuclear processes such as DNA double-strand break repair by non-homologous end joining (NHEJ).^{10–12} Furthermore, in acute and chronic myeloid leukemias an aberrant activity of DNA-PK subunits *Ku70*/*Ku86* has been shown to be a candidate mechanism for chromosomal instability.^{13,14} Therefore, taken into account that DNA-PK subunits not only acting as a precise adjusted entity but also each exhibiting their own distinct func-

tions an imbalance may cause severe disorder to cell metabolism.¹⁵ Consequently, we further analyzed gene expression of the 3 DNA-PK subunits and *Ku86* protein expression in PV CD34⁺ PBSC. Furthermore, in PV bone marrow biopsies cellular distribution and abundance of *Ku86* protein in hematopoiesis was scrutinized.

Material and methods

Study design

After informed consent, bone marrow trephine biopsies and peripheral blood (PB) samples from 9 patients with histopathologically determined chronic phase PV were obtained for diagnostic or therapeutical purpose (phlebotomy). No additional myelosuppressive regimens were administered. The diagnosis of PV was ascertained according to the criteria of the WHO classification of 2001 and all patients also meet the criteria of the new WHO classification of 2008.^{16–18}

At initial diagnosis, all patients presented hemoglobin values of >18.5 g/dl (in men) and >16.5 g/dl (in women), a thrombocytosis of >400 × 10⁹/l, and low Epo levels. Beside biopsies from 5 PV patients in the chronic phase of their disease 5 archived trephine biopsies conducted to evaluate dissemination of the disease were taken from patients with nodal lymphoma (without bone marrow involvement) and 26 blood samples from healthy individuals served as controls. All patients under study carried the *JAK2*^{V617F} point mutation as evaluated by PCR.

Additionally, to verify the influence of the allelic burden of the *JAK2*^{V617F} point mutation due to the RNA expression levels of the 6 genes examined by RT-PCR we used allele specific PCR and PCR product sequencing to answer this question. All patients under study revealed heterozygosity in their CD34⁺ PBSC compartment (Supporting Figure 1).

Selection and isolation of CD34⁺ and CD14⁺ cells

Phlebotomy samples of 500 ml peripheral blood underwent centrifugation over Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) to obtain a mononuclear cell concentrate. Mononuclear cells were labeled with either anti-CD34 micro beads or anti-CD14 micro beads (both Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) and selected by an immunomagnetic separation system according to the manufacturer's instruction (mini-MACS, Miltenyi Biotec). To increase purity of the eluted cells two further passes through

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsors: The Cologne Fortune Foundation, Center for Molecular Medicine, University of Cologne (CMC).

*Correspondence to: Institute of Pathology, University Hospital of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany. Fax: +49 341-97-15009.

E-mail: udo.siebolts@uniklinik-leipzig.de

Received 9 January 2008; Accepted after revision 4 August 2008

DOI 10.1002/ijc.23985

Published online 9 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy

Udo Siebolts,^{1,2} Thoralf Lange,³ Dietger Niederwieser,³ Claudia Wickenhauser¹

► Additional data are published online only at <http://jcp.bmj.com/content/vol63/issue4>

¹Institute of Pathology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

²Centre for Molecular Medicine, University of Cologne (CMMC), Cologne, Germany

³Department of Haematology/Oncology, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Correspondence to

Udo Siebolts, Institute of Pathology, University of Leipzig, Liebigstrasse 26, Leipzig 04103, Germany; udo.siebolts@uniklinik-leipzig.de

Accepted 16 November 2009

ABSTRACT

Screening of JAK2 V617F point mutation becomes more and more important in monitoring of JAK2 positive MPN following stem cell transplantation. In an attempt to achieve the required high sensitivity (1:10⁵), specificity and robustness we created an approach applicable on bone marrow biopsies where we adapted the principle of wild-type blocker PCR with allele-specific Q-PCR. The significance of the assay was demonstrated on a retrospective series of sequential bone marrow biopsies as diagnosis of molecular relapse now preceded the diagnosis of clinical relapse by far. This method offers the urgently needed tool for a systematic molecular analysis of sequential biopsies in the course of stem cell transplantation to develop guidelines for the management of these patients.

The myeloproliferative neoplasms (MPNs) comprise diverse entities of haematopoietic stem cell disorders.^{1–2} A collective finding of some subgroups is an activating point mutation within JAK2 exon 14, JAK2 p.V617F.³ In this context verification of JAK2 p.V617F mutation is an important tool for the initial diagnosis of polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis (PMF) or of advanced disease with predominant osteomyelofibrosis and only low tumour cell density. p.V617F mutation has been further discussed to have a prognostic impact because the mutational status is related to a more favourable outcome in patients with PMF and a more adverse outcome in patients with essential thrombocythaemia.^{1–4} Verification of the mutation also enables patients to be monitored following stem cell transplantation, and it enables selection of patients who would potentially benefit from tyrosine kinase inhibitory therapy.⁵ As retrieval of neoplastic cells may be hampered by bone marrow fibrosis, molecular pathological examination of trephine biopsy samples can offer advantages in test sensitivity.

In principle, a number of approaches exist to permit the detection of point mutations in bone marrow biopsy samples, but each amplification procedure has to deal with an excess of wild-type DNA. PCR amplification and subsequent Sanger sequencing requires the mutated allele to be present at a frequency of at least 20%.² The restriction fragment length polymorphism (RFLP)-PCR

method is highly sensitive, but it is limited by the need for a restriction enzyme site at the position that the base pair substitution is to be detected. In contrast, the amplification refractory mutation system PCR is able to discriminate between templates that differ in a single nucleotide, by using specific 3' primer modification; however, due to non-specific hybridisation of these long oligonucleotides, this method is difficult to perform and false-positive results place great demands on laboratory staff. Finally, multiplex assays with two specific taqman probes labelled with minor groove binder (MGB), resulting in very specific hybridisation, allow detection of wild-type DNA and the mutated region. Therefore, this approach is very practicable, but it is strongly limited by competitive inhibition of the more abundant template.

In an attempt to combine high sensitivity and robustness we created an approach where we adapted the principle of wild-type blocking (WTB)-PCR employing locked nucleotide acid (LNA)-substituted oligonucleotides and the Taq polymerase Stoffel fragment with allele-specific (AS) quantitative real-time PCR (QPCR) applying a two-step procedure. The procedure is described in detail in the supplementary material. The LNA-substituted oligonucleotides demonstrate a strong affinity for complementary sequences, resulting in high melting points, and allowing a LNA oligonucleotide to discriminate a 1 bp difference between templates.^{6–7} In order to allow LNA-substituted oligonucleotides to block amplification of wild-type DNA, it was necessary to apply a mutated form of Taq polymerase (Stoffel fragment) that lacks intrinsic 5'–3' exonuclease activity.

Employing the Stoffel fragment, the LNA oligonucleotides and an appropriate primer, we performed PCR (amplicon of 232 nt) and stopped the reaction after 15 rounds to remain in the exponential phase of amplification. Henceforward, the wild-type:JAK2 p.V617F ratio had turned in favour of the mutated region. The amplified PCR product then was adopted in a nested duplex QPCR assay employing AmpliTaq DNA polymerase and fluorescent-labelled TaqMan minor groove binder probes for the JAK2 wild-type and the region harbouring the specific point mutation (table 1). After 40 rounds of PCR, amplification of the wild-type and/or the point mutation was visualised on a MX3000p

III Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Habilitationsschrift selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut entnommen sind oder sog. geistigem Eigentum anderer entlehnt sind, in jedem Einzelfall kenntlich gemacht habe.

Die Bestimmungen dieser Habilitationsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Habilitationsschrift ist von Frau Professor Dr. Claudia Wickenhauser als Direktorin des Instituts für Pathologie der medizinischen Fakultät der Martin Luther Universität Halle / Wittenberg betreut worden.

Halle, den 25.09.2018 Udo Siebolts

IV Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Ich versichere, dass diese Habilitationsschrift noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie als Habilitationsschrift – abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Habilitationsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Habilitationsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Habilitationsschrift ist von Frau Professor Dr. Claudia Wickenhauser als Direktorin des Instituts für Pathologie der medizinischen Fakultät der Martin Luther Universität Halle / Wittenberg betreut worden.

Halle (Saale), den 25.09.2018

Udo Siebolts

VI Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Udo Siebolts
Geburtsdaten: 15.01.1972 in Aurich; deutsch
Stand: verheiratet, 3 Kinder (13, 7, 7)

Akademische Laufbahn

1992-1994 Vordiplom Biologie; Universität zu Köln
1994-1998 Diplom Biologie; Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg
1998-2004 Studium der Humanmedizin, Universität zu Köln
2000-2002 Promotionsstipendium Köln Fortune Stiftung
12.2004 Approbation, Regierungspräsidium Köln
2005 - 2011 Interdisziplinärer Studiengang Molekulare Medizin
Universität zu Köln
2006 Promotion zum Dr. med., Universität zu Köln (Med. Fak)
2011 Promotion zum Dr. nat. med. (äquivalent zum Dr. rer. nat.)
Universität zu Köln (Med. Fak. und Mat.-Nat. Fak.)

Berufserfahrung

2004-2008 Assistenzarzt, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Köln
2008-2012 Assistenzarzt, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Leipzig
2009-2013 Leitung Molekulare Diagnostik, Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Leipzig
2012 Fachoberarzt am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Leipzig

2012-2013	Oberarzt mit Leitungsfunktion am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Leipzig
Seit 2014	Stellvertretender Institutsdirektor und Leitender Oberarzt am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
Seit 2014	Leitung Sektion Molekulare Diagnostik am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
2015-2017	Ärztlicher Leiter für Pathologie am medizinischen Versorgungszentrum (MVZ), DRK Krankenhaus Luckenwalde

Weitere berufliche Aktivitäten

- 2008 Aufbau Sektion für Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Uniklinikum Leipzig
- 2014 Aufbau Sektion für Molekularpathologie, Institut für Pathologie, Uniklinikum Halle
- Seit 2014 bestellter Prüfer für das medizinisches Staatsexamen M3, Humanmedizin
- Seit 2014 bestellter Prüfer für das zahnmedizinische Staatsexamen Bereich Pathologie
- Seit 2015 Referenzpathologie für maligne Schilddrüsenerkrankungen
- Seit 2017 Co-Sprecher der AG Molekularpathologie (DGP)

Udo Siebolts