

Masterarbeit

**Präfibrotische Primäre Myelofibrose – Einfluss zusätzlicher  
Non-Driver Mutationen auf histomorphologische Parameter**

eingereicht von

**Eva Maier**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science in Medizinischer Genetik (Msc)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

durchgeführt am

Ordensklinikum Linz Elisabethinen –

Abteilung für Hämatologie und Onkologie

unter Anleitung von

**Priv.-Doz. Dr.<sup>in</sup> Veronika Buxhofer-Ausch**

Linz, 19. Juli 2024

### *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Linz, 19. Juli 2024*

*Eva Maier*

## Zusammenfassung

Die präfibrotische, primäre Myelofibrose (präPMF), eine frühe Form der primären Myelofibrose (PMF), ist eine seltene hämatopoetische Stammzellerkrankung aus dem Formenkreis der *BCR::ABL1*-negativen myeloproliferativen Neoplasien (MPN), die über eine klonale Proliferation zu einer Hyperplasie, insbesondere der Megakaryopoese und der Granulopoese führt. Grundlage hierfür ist die konstitutive Aktivierung des Januskinase (JAK) – „Signal Transducer und activator of transcription“ (STAT)-Signalweges über eine der bekannten Driver-Mutationen in den Genen von *JAK2*, des Thrombopoietin-Rezeptors (myeloproliferative leukemia, *MPL*) oder *Calretikulin* (*CALR*). Die primäre Myelofibrose (PMF) geht im Vergleich zur essentiellen Thrombozythämie (ET) und Polycythämia vera (PV) mit einer höheren Symptomlast und höheren Mortalität einher. Prognosescores, die klinische Parameter mit molekularen sowie zytogenetischen Marker kombinieren, erlauben eine individuelle Risikoabschätzung und dementsprechende Behandlungsstrategien. Die Verfügbarkeit des Next-Generation-Sequencing (NGS) hat in den letzten Jahren zu einem enormen Wissenszuwachs mit Definition prognostisch ungünstiger Mutationen geführt. Wie sich das molekulare Profil auf die Histomorphologie des Knochenmarks auswirkt, wurde bei präPMF bislang kaum untersucht und ist Ziel dieser retrospektiven unizentrischen Studie.

An einem nach WHO 2022 klassifizierten Patientenkollektiv mit präPMF und entweder einer nachgewiesenen *JAK2* oder *CALR* Typ1 oder Typ2 Mutation wurden am Knochenmarkbiopsat bei Erstdiagnose (ED) ausgewählte histologische Parameter (Fibrosegrad, Hyperzellularität, Hyperplasie und Clusterbildung der Megakaryopoese) mittels Lichtmikroskopie anhand entsprechender Spezial- sowie immun-histochemischer Färbungen reevaluiert. Die molekularen Parameter wurden für die Driver-Mutationen mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt, eine NGS-Untersuchung gab Aufschluss über das Vorliegen oder Fehlen zusätzlicher Non-Driver Mutationen. Die statistische Auswertung für den Vergleich der Kohorten mit bzw. ohne Non-Driver Mutationen erfolgte mittels „Exakten Test nach Fisher“ oder „Chi-Quadrat-Test“. Für die Korrelationsanalysen und Zusammenhänge der Histomorphologie mit der Art der Driver-Mutation wurden Kontingenzkoeffizienten berechnet. Insgesamt wurden 29 Patient\*innen eingeschlossen, das mediane Alter bei

Diagnose betrug 55,07 Jahre. Eine getrennte Analyse der Patient\*innen anhand der Driver-Mutation zeigte eine deutliche, positive Korrelation der *CALR*- Mutation mit dem Ausmaß der Hyperplasie in der Megakaryopoese.

Siebzehn präPMF-Patient\*innen wurden in 2 Kohorten mit oder ohne Non-Driver Mutationen getrennt analysiert. Die 8 Patient\*innen mit Non-Driver Mutationen waren deutlich älter als die Patient\*innen ohne Non-Driver Mutationen. Dichte Megakaryozytencluster, eine geringgradige Fibrose (MF 1), eine hochgradige Hyperzellularität und eine *JAK2*-Mutation waren häufiger in der Kohorte mit Non-Driver Mutationen.

Diese Studie zeigt, dass einige vorbekannte klinische Besonderheiten bei Patient\*innen mit präPMF mit dem histomorphologischen Erscheinungsbild gut korrelieren. Für eine bessere Aussagekraft und eine Bestätigung der aufgezeigten Tendenzen sind Untersuchungen an größeren Kohorten, sinnvollerweise unter Anwendung computergestützter Programme, erforderlich.

## **Abstract**

Prefibrotic primary myelofibrosis (prePMF), an early form of primary myelofibrosis (PMF), is a rare hematopoietic stem cell disease from the group of *BCR::ABL1*-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), which through clonal proliferation leads to hyperplasia, particularly of megakaryopoiesis and granulopoiesis. The reason for this is the constitutive activation of the Janus kinase (JAK) - Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) - signaling pathway via one of the known driver mutations in the genes of *JAK2*, viz. the thromopoietin receptor (myeloproliferative leukemia, *MPL*) or *calreticulin* (*CALR*). Primary myelofibrosis (PMF) is associated with a higher symptom burden and higher mortality compared to essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV). Prognosis scores that combine clinical parameters as well as molecular and cytogenetic markers allow for individual risk assessment and corresponding treatment strategies. In recent years, the availability of next-generation sequencing (NGS) has led to a substantial knowledge gain, including definitions of prognostically unfavorable mutations. So far, the effect of the molecular profile on the histomorphology of the bone marrow in prePMF has rarely been subject to

investigation. The intention of this thesis is to address this issue by means of a retrospective single-center study.

The data under investigation is a WHO 2022 classified patient collective diagnosed with prePMF and either a detected *JAK2* or *CALR* type1 or type2 mutation. For this dataset, selected histological parameters (degree of fibrosis, hypercellularity, hyperplasia and clustering of megakaryopoiesis) of the bone marrow biopsies, collected at initial diagnosis, were re-evaluated using light microscopy and appropriate special and immunohistochemical staining. The molecular parameters for the driver mutations were determined using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and an NGS analysis provided information on the presence or absence of additional non-driver mutations. The statistical analysis for the comparison of the cohorts with and without non-driver mutations was carried out using Fisher's exact test or the chi-square test. Contingency coefficients were calculated for the correlation analyses and correlations of histomorphology with the type of driver mutation. In total, 29 patients (median age at diagnosis: 55.07 years) were included. A separate analysis of the patients based on the driver mutation showed a positive correlation between the *CALR* mutation and the extent of hyperplasia in megakaryopoiesis.

Seventeen prePMF patients were separated into two 2 cohorts (with or without non-driver mutations). The eight patients with non-driver mutations were significantly older than the patients without non-driver mutations. Additionally, dense megakaryocyte clusters, low-grade fibrosis (MF 1), high-grade hypercellularity and a *JAK2* mutation were more common in the cohort with non-driver mutations.

This study shows that for patients with prePMF, some of the previously identified clinical features correlate well with the histomorphological appearance. For a better significance and confirmation of the trends shown, studies on larger cohorts, ideally using computer-assisted programs, are required.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	2
1.1. Historie und Definition der präfibrotischen primären Myelofibrose .....	2
1.2. Bedeutung von Mutationen und Knochenmarkhistologie .....	3
1.3. Ziel der Studie .....	4
2. Hintergrund .....	4
2.1. MPN .....	4
2.2. präfibrotische PMF .....	10
2.3. Histologie Knochenmarkbiopsie .....	12
2.4. Molekulargenetik.....	18
2.4.1. <i>JAK2</i> .....	19
2.4.2. <i>MPL</i> .....	20
2.4.3. <i>Calretikulin</i> .....	21
2.4.4. Non-Driver Mutationen .....	23
2.5. Prognose und Therapie .....	24
3. Hypothese .....	27
4. Methoden.....	28
4.1. Datenerhebung und Parameter.....	28
4.2. Molekulargenetik.....	29
4.3. Histologie .....	30
4.4. Statistische Analyse .....	30
5. Ergebnisse .....	31
5.1. Patient*innenkollektiv .....	31
5.2. Spektrum molekulargenetischer Mutationen.....	34
5.3. Charakterisierung histologischer Parameter und Einfluss von Driver-.....	36
und Non-Driver Mutationen auf das histomorphologische Bild .....	36
6. Diskussion .....	40
6.1. Limitationen .....	48
7. Konklusion.....	49
8. Literaturverzeichnis.....	50
9. Tabellen.....	59
10. Abbildungen .....	60
11. Abkürzungsverzeichnis.....	61

# 1. Einleitung

## 1.1. Historie und Definition der präfibrotischen primären Myelofibrose

Die präfibrotische, primäre Myelofibrose (präPMF) ist die Frühform der primären Myelofibrose (PMF) und zählt neben der Polyzythämia vera (PV) und der essentiellen Thrombozythämie (ET) zu den klassischen BCR::ABL1- bzw. Philadelphia-negativen myeloproliferativen Neoplasien (MPN) [1].

Nachdem William Dameshek im Jahr 1951 das Konzept der myeloproliferativen Erkrankungen (myeloproliferative disorders, MPD) als erster prägte [2], gelang es Pathologen um Jürgen Thiele im Jahr 1976 - damals unter der Bezeichnung „chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis“ - eine Vorstufe der manifesten Myelofibrose morphologisch und ultrastrukturell zu beschreiben [3] und den stadienhaften Verlauf in weiteren Studien mit sequenzieller, histologisch-klinischer Korrelation zu belegen [4]. Aufgenommen wurde die präPMF in die WHO-Klassifikationen 2001 und 2008 [5,6], zur unabhängigen Entität mit distinkten Diagnosekriterien wurde sie schließlich im Jahr 2016 in der revidierten Fassung der WHO-Klassifikation erklärt (PMF, prefibrotic/early stage) [7].

Es handelt sich dabei um eine hämatopoetische Stammzellerkrankung mit klonaler Expansion der myeloischen Kompartimente unter Beibehaltung einer ausreifenden und effektiven Hämatopoese, wobei der erste, starke Beweis eines klonalen Ursprungs in pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) auf die späten 70er Jahren zurückgeht [8].

Klinisch präsentiert sich die präPMF häufig mit einer grenzwertigen bis geringen Leukozytose, einer milden, therapierefraktären Anämie, einer Thrombozytose und einer minimalen Splenomegalie. Histomorphologisch ist typischerweise eine deutliche Hyperzellularität auffallend, ein Auftreten von atypischen/dysplastischen Megakaryozyten in Clustern, eine hyperplastische Granulopoese und eine hypoplastische Erythropoese. Eine manifeste Myelofibrose (MF) > Grad 1 fehlt hingegen [9,10].

## 1.2. Bedeutung von Mutationen und Knochenmarkhistologie

Die nach WHO-Kriterien definierte PMF ist in ca. 90% assoziiert mit einer der drei bekannten Driver-Mutationen, von denen aktivierende Mutationen im *Januskinase 2 (JAK2)* -Gen mit 58 - 66% die größte Gruppe darstellen, *Calretikulin (CALR)*-Mutationen mit 19,4 - 25% an zweiter Stelle liegen und Mutationen im Thrombopoetin-Rezeptor-Gen (myeloproliferative leukemia, *MPL*) in 5,4 - 8% der PMF-Fälle gefunden werden, ca. 10% sind triple negativ [11,12]. Diese Driver-Mutationen schließen sich in der Regel gegenseitig aus und sind verantwortlich für den myeloproliferativen Phänotyp der Erkrankung [13,14].

Die zentrale Rolle in der Pathogenese kommt der konstitutionellen, transkriptionellen Aktivierung des JAK- „Signal Transducer und activator of transcription“ (STAT)-Signalweges zu und dies unabhängig davon, ob eine *JAK2*-Mutation oder eine andere Driver-Mutation vorliegt, was anhand von Genexpressionsanalysen gezeigt werden konnte [15]. Diese Driver-Mutationen, auch „disease driver“- bzw. „disease phenotypic driver“- Mutationen genannt, beeinflussen den klinischen MPN-Phänotyp. Davon abgegrenzt werden zusätzliche somatische Mutationen, sog. „clonal-driver“ Mutationen bzw „non-driver“-Mutationen, die nicht MPN-spezifisch sind, aber die Prognose verändern können, wenn sie zusammen mit einer der drei „disease driver“-Mutationen auftreten. Zu den häufigsten gehören Mutationen im *TET2*-, *DNMT3A*-, *ASXL1*- und *EZH2*-Gen. Der zunehmende klinische Einsatz des Next-Generation-Sequencing (NGS) und des Whole-Exom- Sequencing (WES) hat einen enormen Informationsgewinn über das Mutationsprofil und dadurch ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Genetik der MPNs bewirkt. Zunehmend wird das Wissen um das molekulare Profil auch in Prognosescores eingearbeitet [16].

Viel früher als die Mutationsanalyse hat sich die Histologie als ein Hauptkriterium zur Diagnose der präPMF etabliert. Die histologische Beurteilung von repräsentativen Knochenmarkbiopsien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist für eine exakte Klassifizierung von essenzieller Bedeutung [17]. Insbesondere sind die reproduzierbare Quantifizierung der Zellularität sowie die Graduierung der Fibrose relevant für Risikostratifizierung, Prognose und Beurteilung Therapie-assoziierten Veränderungen. In Ergänzung zu klinischen Prognosescores helfen sie der



Identifizierung von Patienten mit schlechterer Prognose, die möglicherweise einer aggressiveren Therapie bedürfen [18,19].

### 1.3. Ziel der Studie

In dieser Arbeit wird an einem Patientenkollektiv die Histomorphologie der präPMF, speziell die Zellularität, der Fibrosegrad und die Morphologie der Megakaryozyten genau charakterisiert und in Hinblick auf eine Abhängigkeit von dem molekularen Profil unter bevorzugter Betrachtung zusätzlicher Non-Driver Mutationen untersucht. Die Publikationen betreffend molekulargenetische Veränderungen bei präPMF haben zwar in den letzten Jahren deutlich zugenommen, die Fachliteratur zu einem möglichen Zusammenhang des histomorphologischen Befundes und dem molekulargenetischen Profil sind jedoch spärlich. Meine Arbeit beschäftigt sich daher mit dieser Frage, indem eine retrospektive Analyse an einer gut definierten Patientenkohorte durchgeführt wurde.

## 2. Hintergrund

### 2.1. MPN

In der aktuellen Edition der WHO-Klassifikation werden zur Kategorie der MPN neben den klassischen Philadelphia-negativen Entitäten (PV, ET und PMF) auch die chronische myeloische Leukämie (CML), sowie die selteneren Entitäten chronische Neutrophilenleukämie (CNL), die nicht anders spezifizierte chronische Eosinophilenleukämie (CEL-NOS) und die unklassifizierbare MPN (MPN-U) gezählt [7,20]. Die Diagnose dieser Erkrankungsgruppe basiert vornehmlich auf der Morphologie als ein zentrales Unterscheidungsmerkmal [7,20–22].

Bei den MPN handelt es sich um Neoplasien des blutbildenden Systems, die von einer somatisch mutierten, pluripotenten Stammzelle ausgehen und zu einer klonalen Expansion eines oder mehrerer hämatopoetischer Kompartimente mit gesteigerter Produktion ausdifferenzierter, funktionsfähiger Blutzellen führen [23]. Der Klonalitäts-

nachweis wurde in Studien in den 70er Jahren an Patientinnen mit PV bzw. PMF anhand des Genlocus für die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) auf dem X-Chromosom gezeigt [8,24]. Dieses Gen, das für das Enzym G-6-PD kodiert, unterliegt der X-chromosomalen Inaktivierung, sodass in normalen somatischen Zellen, so auch den Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, nur entweder das paternale oder das maternale Gen aktiv ist, wodurch ein Mosaik aus entsprechenden Zellen vorhanden ist [25]. In Patient\*innen mit MPN fand sich in den peripheren Blutzellen allerdings nur ein Isoenzym, was als Nachweis eines klonalen Ursprungs in pluripotenten HSC anzusehen ist [8,24]. Mittlerweile weisen rezenteren Publikationen auf Basis von Einzelzellanalysen daraufhin, dass es sich wohl um oligoklonale Erkrankungen handelt. Anhand von wiederholten NGS-Analysen an CD34+ Zellen im zeitlichen Verlauf ließ sich die Dynamik in der klonalen Evolution der Erkrankung mit dominanten Klonen und Subklonen unter Berücksichtigung der Krankheitsprogression (akzelerierte bzw. Blastenphase) darstellen [26,27].

Mutationen im JAK-STAT-Signalweg stellen eine sehr häufige genetische Veränderung bei verschiedenen MPNs dar. Die Beschreibung der sog. Driver-Mutationen in den Genen *JAK2*, *MPL* und *CALR* hat zu einem tieferen Verständnis der Pathogenese der MPNs geführt. Auch unabhängig vom *JAK2*-Mutationsstatus ist die konstitutionelle Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges ein Charakteristikum der Philadelphia-negativen MPNs, beispielsweise zeigen auch *CALR*-mutierte Patient\*innen ein distinktes Genexpressionsprofil mit Hochregulierung von *JAK2*-Zielgenen [28].

Neben dem JAK-STAT-Signalweg haben auch die Phosphoinositid-3-Kinase/AKT Serin-Threonin-Kinase (PI3K/AKT)- und die „rat sarcoma virus“ (Ras)/„rapidly accelerated fibrosarcoma“ (Raf)/„mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/„extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) („mitogen-activated protein“ Kinase, MAPK)- Signalkaskade eine Bedeutung bei den MPN, wie Abbildung 1 veranschaulicht. Die Aktivierung des Erythropoetin-Rezeptors (EPOR), des Thrombopoietin-Rezeptors (MPL) sowie des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor-Rezeptors (G-CSF-R) durch die entsprechenden Hormone fördert über die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges die Proliferation. In welchem Gleichgewicht die STAT1/3/5-Signalübertragung steht, kann letztlich Einfluss auf den endgültigen Krankheitsphänotyp haben. Bei Berücksichtigung dieser anderen, für MPN relevanten

Signalkaskaden wird ersichtlich, dass trotz JAK-Inhibitortherapie eine persistierende Aktivierung der MAPK- oder PI3K-Signalkaskade oder der STAT-Serin-phosphorylierung auftreten kann. Diese erwähnten intrazellulären Signalkaskaden, sowie Beispiele für intrazelluläre negative Rückkopplungsmechanismen, sind in Abbildung 1 dargestellt. Das Verständnis dieser komplexen, intrinsischen Regulierung der intrazellulären Signalübertragung ist Basis für die Entwicklung neuer Therapieoptionen [29].

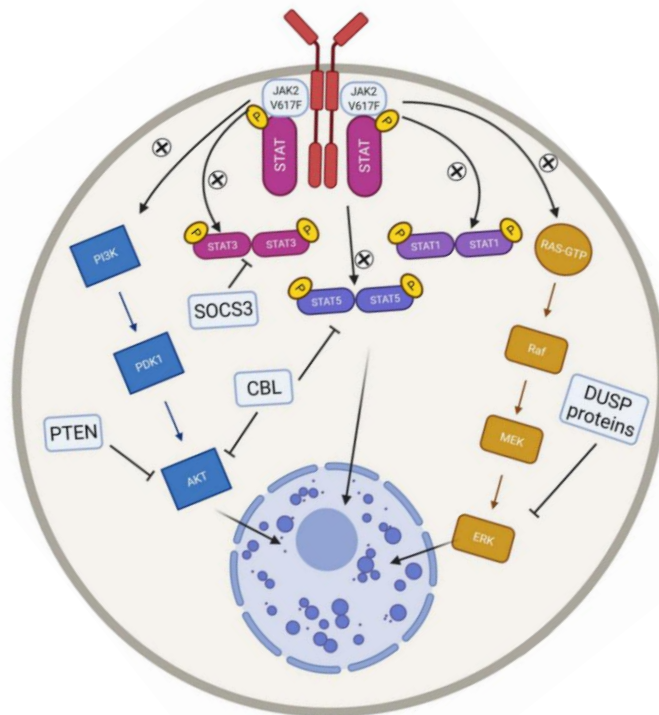


Abbildung 1: **Aktivierte Signalkaskaden in MPN** [29] <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Der Phänotyp der MPN wird im Wesentlichen durch die Art der Driver-Mutation bestimmt. Abbildung 2 demonstriert Einflussfaktoren auf den Phänotyp anhand der Entitäten PV und ET, wobei ein biologisches Kontinuum von Thrombozytose bis zur Erythrozytose modelliert wird. Bei Vorliegen einer *JAK2* V617F-Mutation sind weitere Faktoren wie Geschlecht, Homozygotie der Mutation, Erythropoetin (EPO)-Spiegel, Nierenfunktion und Eisenstatus für das Gleichgewicht zwischen Erythrozytose und Thrombozytose relevant [14].

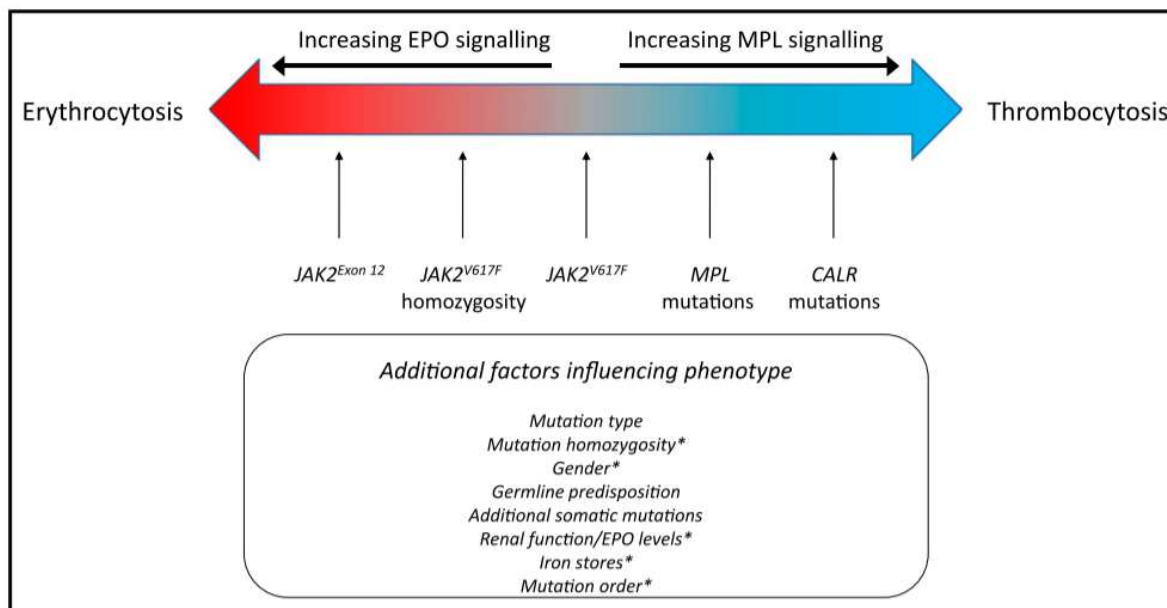


Abbildung 2: **Klinische Präsentation in Abhängigkeit von „phenotypic driver“-Mutationen** [14]

Große Studien haben gezeigt, dass Driver- Mutationen in den Genen *JAK2*, *CALR* und *MPL* bei 45% der MPN die einzige genetische Abnormalität darstellen. Im Übrigen sind zusätzliche pathogene Mutationen in Genen betreffend epigenetische Regulation, Transkriptionsfaktoren und RNA- Splicing vorhanden, unter denen *ASXL1*, *DNMT3A* und *TET2* mit einer Häufigkeit von zumindest 5% der gesamten MPN-Fälle zu finden sind. *CBL*, *SF3B1*, *EZH2*, *TP53*, *SRSF2*, *U2AF1* und *IDH1/2* zeigen pathogene Varianten in weniger als 2% der Patient\*innenproben [30].

Fasst man die Ergebnisse multivariater Analysen von vier großangelegten Studien zusammen, kann den Non-Driver Mutationen bei MPN ein prognostischer Wert in Hinblick auf das Gesamtüberleben beigemessen werden (Abbildung 3). Dabei ist festzuhalten, dass bei PV und ET in der chronischen Phase die Wahrscheinlichkeit, keine zusätzlichen Mutationen zu haben signifikant häufiger ist als bei PMF. Abbildung 3 zeigt den Einfluss der mutierten Gene auf die Entwicklung einer Fibrose und leukämische Transformation in einer Kohorte von >1800 MPN-Patient\*innen. Mutationen in den Genen *IDH2*, *EZH2*, *ASXL1*, *SRSF2* und *U2AF1* haben sich in den jeweiligen Studien für die PMF als unabhängiger Risikofaktor auf das Überleben erwiesen [29–33].

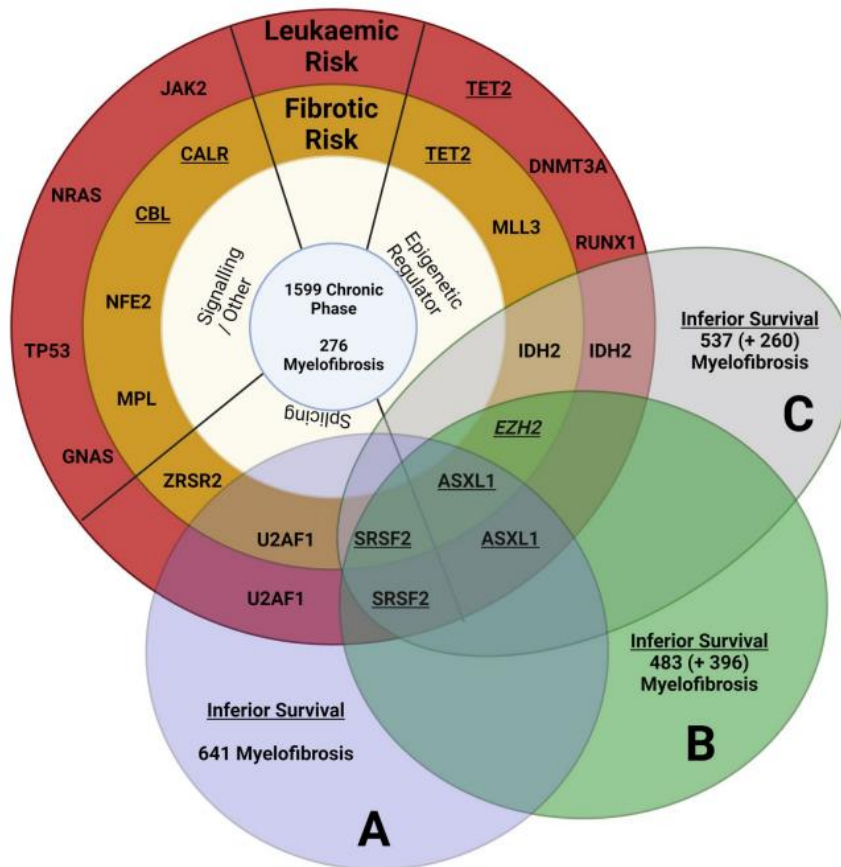


Abbildung 3: **Bedeutung von Mutationen in MPN bzw. PMF für die Gesamtüberlebensrate** [29] <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Eine umfassende Übersicht über pathogene somatische Mutationen in MPN, die die Ergebnisse zahlreicher publizierter Studien inkludieren, ist in Tabelle 1 unter zusätzlicher Angabe des Genlocus, der Art der Mutation, der Proteinfunktion, der Häufigkeit sowie der klinischen Konsequenz dargestellt.

**Tabelle 1: Somatische Mutationen in MPN [23]**

Gene function and symbol	Location	Type of mutations	Protein function	Frequency	Consequences	Reference
<b>Signaling MPN driver</b>						
JAK2	9p24	JAK2V617F	Tyrosine kinase associated with cytokine receptors	95% PV, 50%-60% PMF and ET	Increased RBC, platelet, and granulocyte production	4-7
		JAK2 exon 12		3% PV	Increased RBC	17
MPL	1p34	MPLS15L/K/A/R MPLS505N Other missense mutations	TPOR	2%-3% ET 3-5% PMF	Increased platelet production	19, 22, 23 25
CALR	19p13	Indel exon 9	Mutant: activator of MPL	20%-25% ET, 25%-30% PMF	Increased platelet production	28, 29
<b>Other signaling</b>						
LNK	12q24	Missense (loss of function) deletion	Negative regulator of JAK2	1% ET, 2% PMF	Synergy with JAK2V617F- Disease progression	35
CBL	11q23;3	Missense (loss of function)	Cytokine receptor internalization	4% PMF	Disease progression (progression to AML)	110
NRAS	1p13.2	Missense (activation)	ERK/MAPK signaling	Rare PMF	Progression to leukemia (5%-10% in secondary AML)	65
NF1	17q11	Missense deletion	ERK/MAPK signaling	Rare PMF	Progression to leukemia (5%-10% in secondary AML)	66
FLT3	13q12	FLT3-ITD	Cytokine receptor (FLT3-L)	MPN (<3%)	Progression to leukemia (10%-15% in secondary AML)	100
<b>DNA methylation</b>						
TET2	4q24	Missense, nonsense deletion	$\alpha$ -Ketoglutarate-dependent dioxygenase Oxidation of 5mC into 5hmC and active 5mC demethylation	10%-20% MPN (ET, PV, and PMF)	Initiation, Mutations on 2 alleles associated with progression	70
DNMT3A	2p23	Missense, hotspot	DNA methylase, de novo methylation	5%-10% MPN (ET, PV, and PMF)	Initiation	74
IDH1	2q33.3	Missense, hotspot	Neomorphic enzyme, generation of 2-hydroxyglutarate blocking $\alpha$ -ketoglutarate-dependent enzymes	1%-3% PMF	Initiation, Disease progression	111
IDH2	15q26.1	Missense, hotspot	Neomorphic enzyme, generation of 2-hydroxyglutarate blocking $\alpha$ -ketoglutarate-dependent enzymes	1%-3% PMF	Initiation, Disease progression	111
<b>Histone modifications</b>						
EZH2	7q35-36	Missense, indel	H3K27 methyltransferase, loss of function	5%-10% PMF	Initiation Disease progression	82, 83
ASXL1	20q11	Nonsense/ indel	Chromatin-binding protein associated with PRC1 and 2	25% PMF 1%-3% ET/PV	Initiation Rapid progression	69
<b>Transcription factors</b>						
TP53	17p13.1	Missense/ indel	Transcription factor regulating cell cycle, DNA repair and apoptosis	<5% (20% of sAML)	Progression to leukemia (mutations on both alleles) complex karyotype	98
CUX1	7q22	Deletion 7p	Transcription factor regulating TP53 and ATM	<3%	Progression to leukemia	112
IKZF1	7p12.2	Deletion 7p, indel	Master transcription factor in lymphopoiesis	<3%	Progression to leukemia	112
ETV6	12p13	Missense/ indel	Transcription factor of the ETs family	<3%	Progression to leukemia	112
RUNX1	21q22.3	Nonsense/ missense/ indel	Master transcription factor in hematopoiesis	<3% (10% of sAML)	Progression to leukemia	112
<b>RNA splicing</b>						
SRSF2	17q25.1	Missense, hotspot	Serine/arginine-rich pre- RNA splicing factor	<2% ET 10%-15% PMF (association with IDH mutations)	Initiation? Progression	94
SF3B1	2q33.1	Missense	RNA-splicing factor 3b subunit 1, part of U2	<3% ET	Phenotypic change (anemia)	113
U2AF1	21q22.3	Missense	U2 small nuclear RNA-splicing factor	10%-15% PMF	Phenotypic change (anemia)	94

Die Inzidenz der Philadelphia-negativen MPNs scheint über die Jahre weitgehend stabil zu bleiben und liegt beispielsweise für das Jahr 2016 in den USA bei 2,7 pro 100.000 Personen. Für die PMF wird eine durchschnittliche Inzidenz von 0,33 pro 100.000 Personen pro Jahr angegeben (Datenerhebung der Jahre 2001-2016 in den USA). Unter allen MPN zeigt die PMF die schlechteste Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von 46%, während jene für die PV und die ET bei 89% bzw. 91% liegt (bei Patienten mit Diagnosestellung 2001-2011 in den USA) [34].

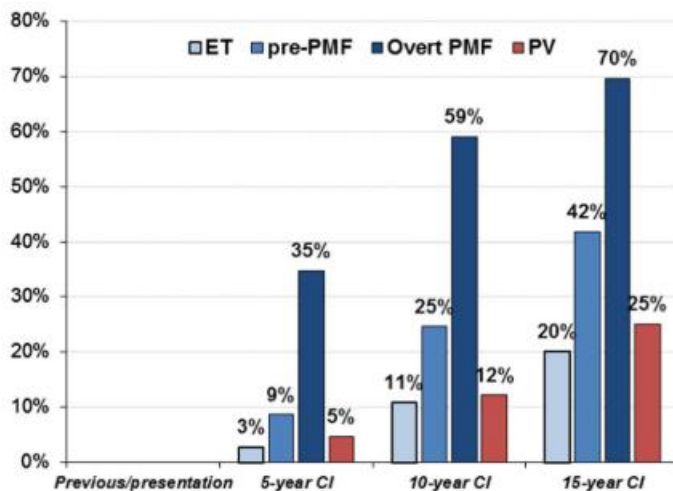
Trotz der Heterogenität der verschiedenen MPN-Entitäten ähneln sich diese grundsätzlich in klinischen, pathologischen und molekularen Merkmalen. Klinische Komplikationen stellen das erhöhte Thromboserisiko, die durch proinflammatorische Zytokine verursachten konstitutionellen Symptome, die Splenomegalie sowie das Risiko der leukämischen Progression dar [35]. In einer großen Bevölkerungsbasierten Studie in Schweden, die knapp 9.500 MPN-Patient\*innen umfasst, wird ein 3- bzw. 10-fach erhöhtes Thromboserisiko für MPN-Patient\*innen im Vergleich zur Normalbevölkerung für arterielle bzw. venöse Thrombosen angegeben, wobei das höchste Risiko offenbar kurz nach Diagnosestellung erreicht wird und im Verlauf signifikant erhöht bleibt [36]. Zytoreduktive Therapien wie JAK2-Inhibitoren und Interferon dürften sich in bisherigen Studien positiv auf das Thromboserisiko auswirken [37,38].

Die derzeitigen therapeutischen Ansätze umfassen Thrombozytenaggregationshemmer, Antikoagulantien, Aderlässe und zytoreduktive Therapien, die Hydroxycarbamid, Anagrelid und Interferon-alpha inkludieren. Auch JAK2-Inhibitoren haben sich als vorteilhaft erwiesen, auch wenn sie einen eingeschränkten Krankheitsmodifizierenden Effekt aufweisen. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt die einzige potenziell kurative Therapieoption dar, wobei es eines genauen Abwägens von Nutzen und Risiko bedarf [29].

## 2.2. präfibrotische PMF

Die Abgrenzung der ET zur präPMF ist insbesondere deshalb relevant, da sich Klinik und Prognose deutlich unterscheiden. Während die ET häufig einen günstigen Verlauf in Bezug auf Überleben, Entwicklung einer Fibrose und Übergang in Blastenphase

aufweist, ist das Risiko eines Übergangs der präPMF in ein fibrotisches Stadium, Entwicklung einer Blastenkrise, Mortalität und Blutungsneigung vergleichsweise beträchtlich höher. Die Wahrscheinlichkeiten innerhalb von 5, 10 bzw. 15 Jahre nach Diagnosestellung an der Erkrankung zu versterben (kumulative Inzidenz der Mortalität) sind in Abhängigkeit von der Entität (ET, präPMF, PMF in fibrotischem Stadium und PV) in Abbildung 4 dargestellt [39].



**Abbildung 4: Vergleich der kumulativen Inzidenz der Mortalität zwischen ET, präPMF, fortgeschrittener PMF und PV jeweils 5, 10 und 15 Jahre nach der Diagnose [39]**

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Während das mediane Gesamtüberleben für die ET bei 30,2 Jahren liegt, ist dieses für die präPMF mit 14,7 und die PMF in fibrotischem Stadium mit 7,2 Jahre signifikant kürzer [40]. In großen internationalen Studien haben sich signifikante Unterschiede zwischen ET und präPMF in der Leukozytenzahl, dem Hämoglobin-Wert (Hb), der Thrombozytenzahl, der Laktatdehydrogenase (LDH), den CD34-positiven Zellen im peripheren Blut (PB), der Inzidenz einer palpablen Splenomegalie, sowie einer Knochenmarkfibrose MF1 gezeigt, die mit Ausnahme des Hb-Wertes jeweils bei der präPMF höher waren. Neben der charakteristischen Morphologie des Knochenmarks, sind als Surrogatmarker die erhöhte LDH, die Anämie und die Leukozytose zur Differenzierung der präPMF von der ET etabliert [41].

In der aktuellen WHO-Klassifikation sind die derzeit gültigen Kriterien zur Diagnose der präPMF aufgelistet (Tabelle 2). Es sind alle drei Hauptkriterien und zumindest ein Nebenkriterium erforderlich, dementsprechend kommt der Histomorphologie und der Molekulargenetik eine entscheidende Bedeutung zu.



Tabelle 2: **WHO-Kriterien der präPMF** [7,22]

<b>Hauptkriterien</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Proliferation und Atypie in Megakaryopoese, ohne Retikulinfibrose &gt;Grad 1, begleitet von erhöhter altersangepasster KM-Zellularität, granulozytärer Proliferation und häufig verminderter Erythropoese</li><li>2. Keine Erfüllung der WHO-Kriterien für <i>BCR::ABL1</i>+ CML, PV, ET, myelodysplastisches Syndrom oder andere myeloische Neoplasien</li><li>3. Vorhandensein einer <i>JAK2</i>-, <i>CALR</i>- oder <i>MPL</i>-Mutation ODER bei Fehlen dieser Mutationen Vorhandensein eines anderen klonalen Markers ODER Fehlen einer geringfügigen reaktiven KM-Retikulinfaserfibrose</li></ol>
<b>Nebenkriterien</b>
Vorhandensein von mindestens einem der folgenden Punkte, bestätigt durch 2 aufeinanderfolgende Bestimmungen: <ol style="list-style-type: none"><li>a. Anämie, die nicht auf eine Begleiterkrankung zurückzuführen ist</li><li>b. Leukozytose <math>\geq 11 \times 10^9/L</math></li><li>c. Palpable Splenomegalie</li><li>d. LDH über der Normgrenze des Referenzbereichs erhöht</li></ol>
<b>Die Diagnose einer prä-PMF erfordert die Erfüllung aller 3 Hauptkriterien und mindestens 1 Nebenkriterium</b>

### 2.3. Histologie Knochenmarkbiopsie

Zur adäquaten und insbesondere diagnostisch determinierenden Beurteilung des Knochenmarks ist zunächst die Bestimmung der Zellularität erforderlich, die grundsätzlich altersabhängig ist. Angegeben wird der Prozentsatz der Fläche, der am histologischen Schnittpräparat von hämatopoetischen Zellen eingenommen wird (Abbildung 5) [42].

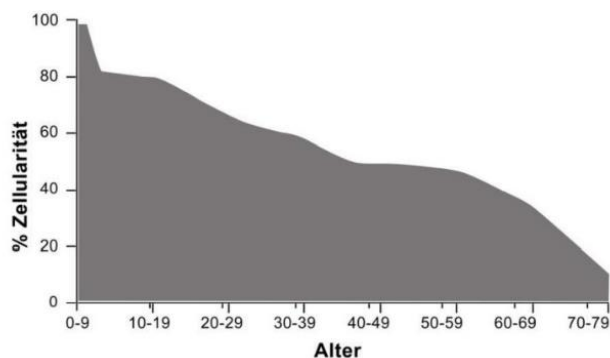


Abbildung 5: **Altersabhängige Zellularität des Knochenmarks** [42]

Üblicherweise wird ein linearer Zusammenhang zwischen Alter und Zellularität des Knochenmarks zur Angabe der Normozellularität herangezogen („100% minus Alter in Dekaden“). Rezentere Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass die Spanne weiter ist als ursprünglich gedacht und die Zellularität insbesondere älterer Patient\*innen (> 60-70 Lebensjahre) mit dem Alter nicht mehr linear abnimmt. Viel eher sollte eine Skala mit vier Altersgruppen angewendet werden (Tabelle 3) [43].

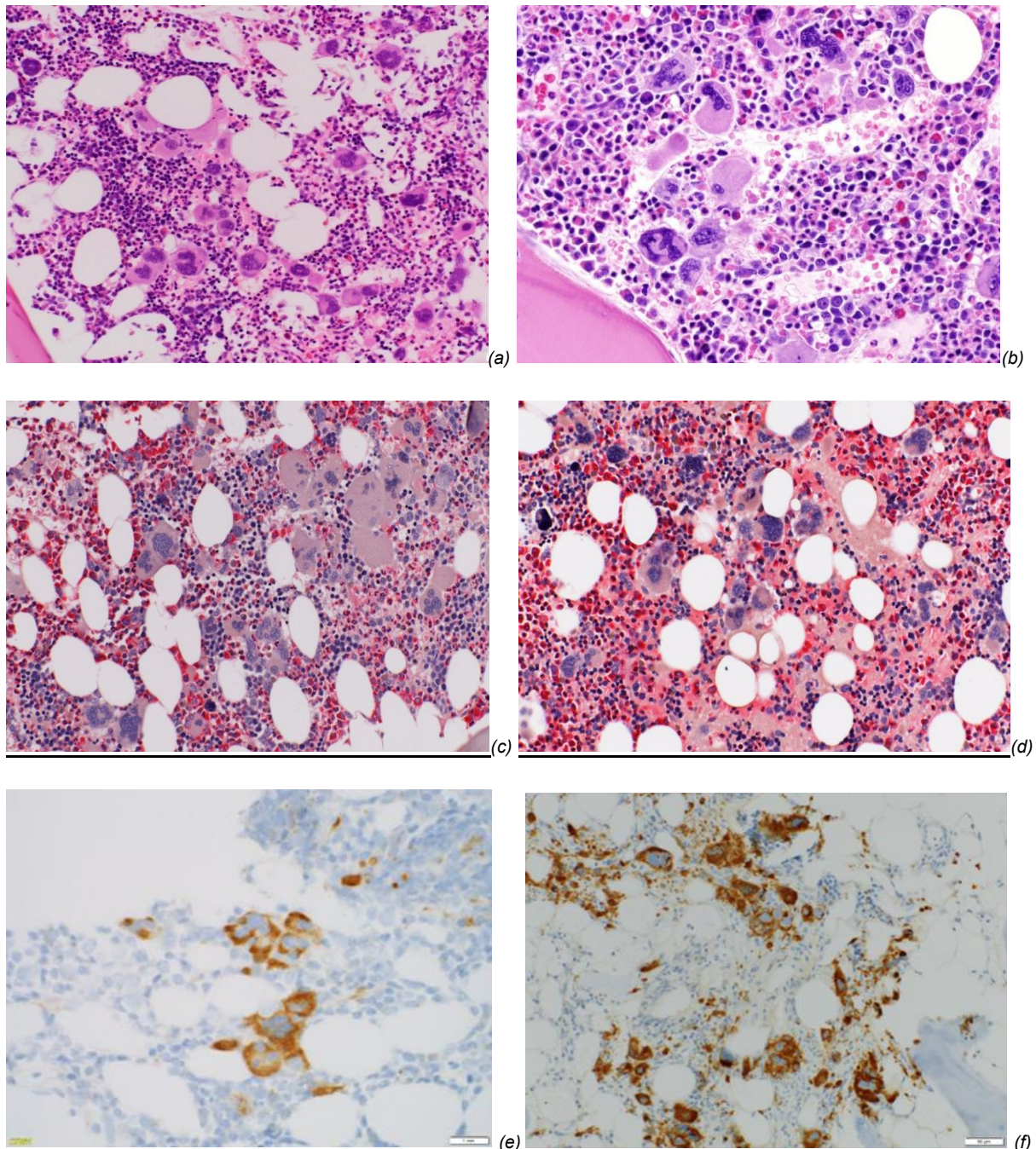
Tabelle 3: **Vorschlag für Definition der Zellularität & Einteilung in Altersgruppen** [43]

Age group, y	Hypocellularity, %	Normocellularity, %	Hypercellularity, %
<20	<45	45-85	>85
20-40	<40	40-70	>70
40-60	<35	35-65	>65
>60	<30	30-60	>60

Neben einer auffallenden (mittel- bis hochgradigen) Hyperzellularität sind insbesondere prominente Abnormalitäten in der Megakaryopoese zusammen mit gesteigerter Granulopoese und reduzierter Erythropoese typisch für das histomorphologische Bild der präPMF und speziell hilfreich in der Abgrenzung gegenüber der ET. Als robustestes Kriterium haben sich die Atypien in der Megakaryopoese und der histotopographischen Lagerung in Aggregaten bzw. Cluster erwiesen. Die Megakaryozyten variieren in der Größe (klein bis riesengroß), weisen Zeichen einer Reifungsstörung auf (plumpe Lobulierung der Zellkerne, bizarre Kernform, variabel dichtes Chromatin, verschobene Kern/Zytoplasma-Ratio, viele

nackte Kerne) und bilden häufig Cluster aus (kleine,  $\geq 3$  bzw. große,  $> 7$  Megakaryozyten umfassend, locker bzw. dicht) [10,44].

Abbildung 6 zeigt Beispiele typischer morphologischer Veränderungen in der Megakaryopoese bei präPMF.



**Abbildung 6: Charakteristische Morphologie der Megakaryopoese bei präPMF:** (a) Verschiebung der Kern/Zytoplasma-Ratio, hypolobulierte Kerne mit „wolkigem Chromatin“, sog. „bulbous nuclei“ (HE = Hämatoxylin-Eosin-Färbung). (b) bizarre, atypische Formen und intrasinusoidale Lagerung (HE-Färbung). (c) Größen- und Formvarianz (NACE = Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung). (d) nackte Zellkerne (NACE-Färbung). (e) kleine dichte Cluster (CD42b-Immunhistochemie). (f) große dichte Cluster (CD42b-Immunhistochemie).



Von Seiten vor allem deutscher Hämatopathologen wurde große Anstrengung zur Standardisierung von histomorphologischen Merkmalen für die semiquantitative Bewertung und Interpretation von Knochenmarkbiopsien aufgewendet und speziell eine Unterscheidung von histologischen Mustern angestrebt [45].

Dass das Erkennen histologischer Muster gegenüber isolierten Merkmalen entscheidend ist, hat eine Studie zur Reproduzierbarkeit der histopathologischen Unterscheidung der präPMF von der ET gezeigt. So konnte unter einer Expertengruppe von Hämatopathologen eine 88%ige Konkordanz bei verblindeter Auswertung erzielt werden. Zur Anwendung kamen mehr als 20 standardisierte morphologische Merkmale zusammengefasst in 4 Hauptvariablen (neutrophile Granulopoese, Erythropoese, Megakaryopoese, Faserfibrose), die semiquantitativ evaluiert wurden [46].

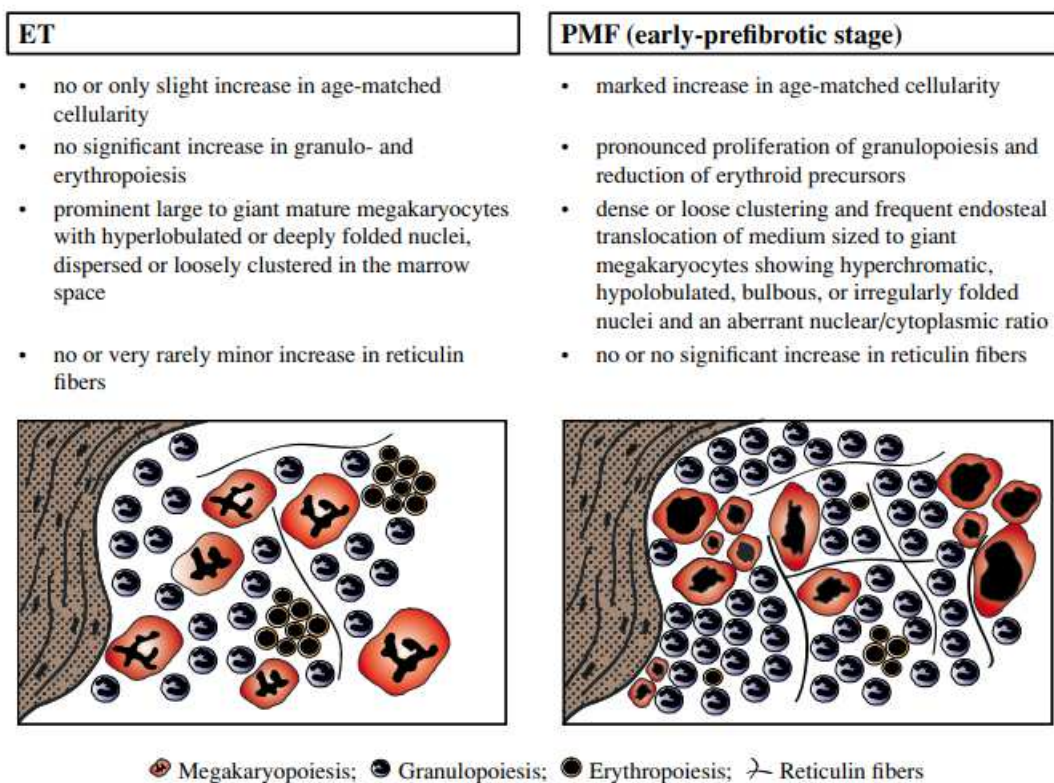


Abbildung 7: **Diagnostische Kriterien zur Unterscheidung zwischen ET und präPMF, einschließlich standardisierter morphologischer Merkmale** [46]

Welche Bedeutung die Integration klinischer Daten in die morphologische Beurteilung des Knochenmarks hat, zeigt sich in einer dänischen Studie, die sich ebenfalls mit der Reproduzierbarkeit der histologischen Diagnose von MPN beschäftigt. Während bei Beurteilung der Histologie allein unter den teilnehmenden Pathologen lediglich ein

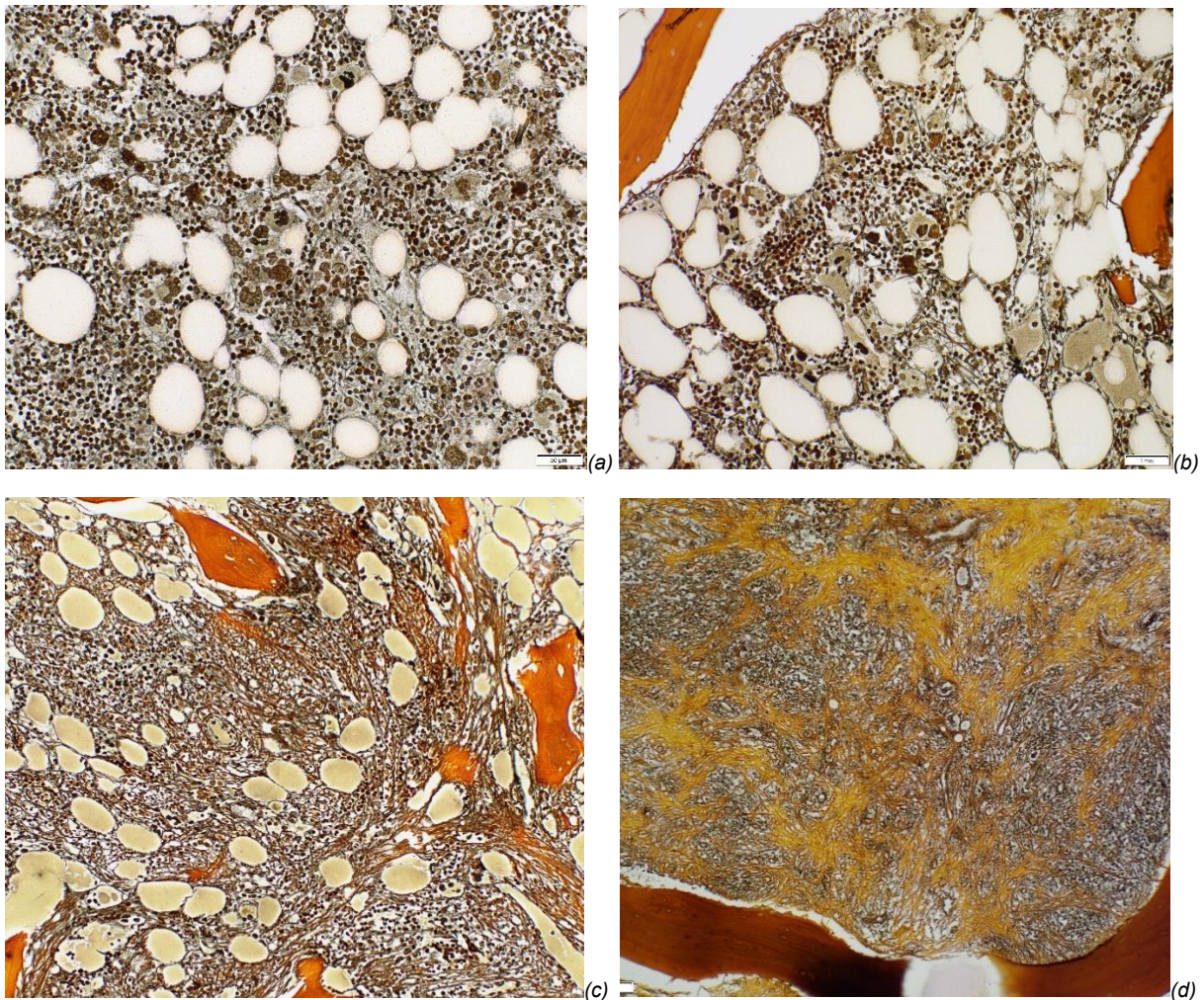
Konsens von 60% erzielt wurde, konnte dieser nach Hinzufügen klinischer Daten auf 83% angehoben werden [47].

Ein weiteres Merkmal bei der Diagnose der PMF, das ganz klar in die Domäne der Histopathologie fällt, ist - neben der Bestimmung der Zellularität und der quantitativen sowie qualitativen Veränderung in der Megakaryopoese - die Beurteilung der Myelofibrose (Retikulin- bzw. Kollagenfaserfibrose und Osteosklerose). Im Jahr 2005 wurde ein europäischer Konsens zur Graduierung derselben erzielt, die Richtlinien hierzu sind in Tabelle 4 beschrieben [19]. Der Grad der Myelofibrose bei PMF korreliert mit typischen klinischen Merkmalen. Die Zunahme der Myelofibrose im Sinne eines Krankheitsprogresses von frühem Stadium (MF 0-1) zu fibrotischem Stadium der PMF (MF  $\geq$ 2) ist signifikant assoziiert mit zunehmender Anämie, Splenomegalie, dem Auftreten von peripheren Blasten (leuko-erythoblastisches Blutbild) und einer normalen bis verminderten Thrombozytenzahl [48]. Eine exakte Graduierung ist insbesondere wichtig, um die Dynamik bzw. den Progress der Erkrankung zu bewerten, was wiederum relevant für die Risikostratifizierung und therapiebedingten Veränderungen ist. Das Fibrose-Scoring-System hat sich in multivariaten Analysen als unabhängiger Prognosefaktor auf das Überleben erwiesen, wobei in Kombination mit dem klinischen Scoring-System IPSS (Internationale Prognose Scoring System) noch eine bessere Vorhersage gelingt [19,49].

**Tabelle 4: Semiquantitative Graduierung der Myelofibrose** [7,19]

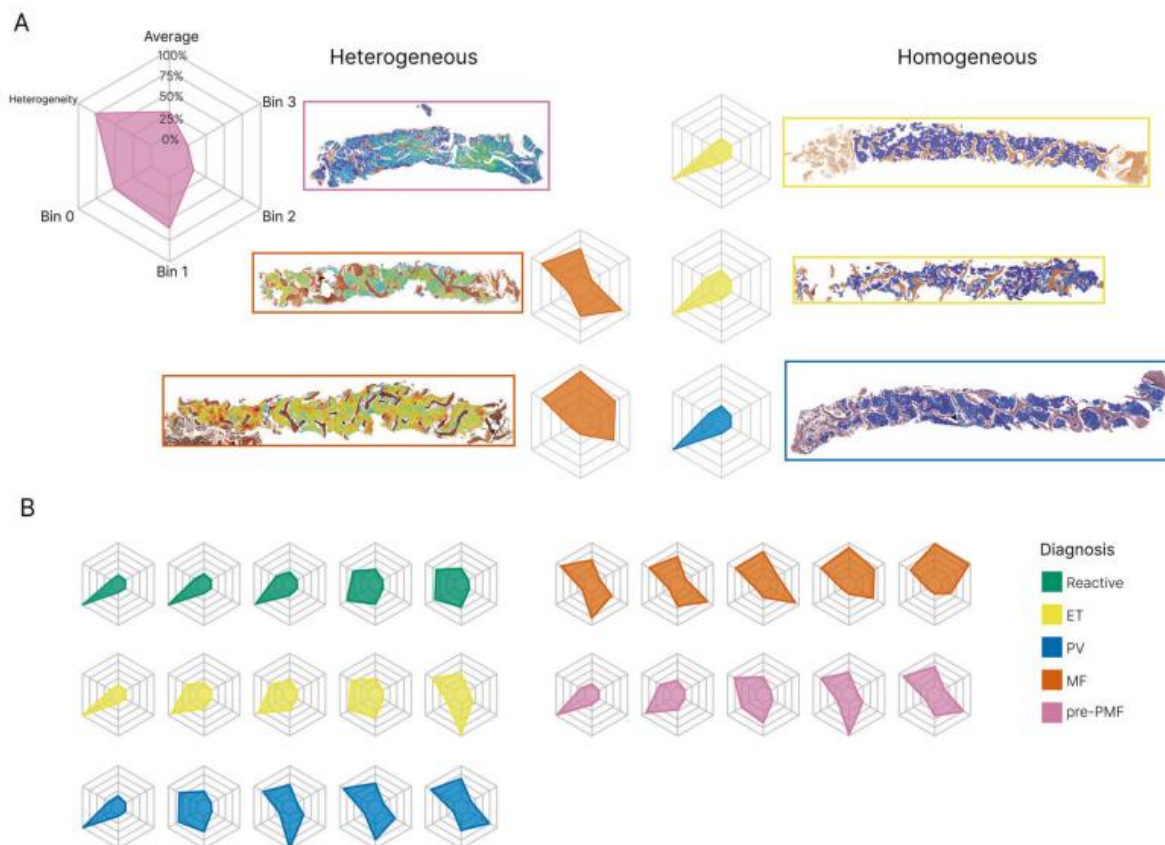
<b>MF-0</b>	Verstreute, lineare Retikulinfasern ohne Überschneidungen entsprechend normalem Knochenmark
<b>MF-1</b>	Lockerer Netz aus Retikulinfasern mit vielen Überschneidungen, vor allem in perivaskulären Bereichen
<b>MF-2</b>	Diffuse und dichte Zunahme des Retikulins mit ausgedehnten Überschneidungen, gelegentlich mit nur fokalen Kollagenbündeln und/oder fokaler Osteosklerose
<b>MF-3</b>	Diffuse und dichte Zunahme des Retikulins mit ausgedehnten Überschneidungen und groben Kollagenbündeln, oft in Verbindung mit erheblicher Osteosklerose
Ist das Fibrosemuster heterogen, wird der Wert durch den höchsten Grad bestimmt, der in mindestens 30 % des Knochenmarks vorhanden ist. Die Fibrosedichte sollte nur im hämatopoetischen Bereich erfasst werden.	





**Abbildung 8: Darstellung der Myelofibrose (MF) mittels Versilberung nach Gomori:**  
 Retikuläre Fasern stellen sich schwarz und kollagene Fasern gelb-orange dar.  
 (a) MF 0. (b) MF 1. (c) MF 2. (d) MF3.

Ein experimentelles Computer-gestütztes Modell (Continuous Indexing Fibrosis = CIF) einer britischen Forschergruppe berücksichtigt im Gegensatz zu dem derzeit angewandten semiquantitativen Fibrose-Scoring auch die topographische bzw. lokoregionäre Heterogenität der Ausprägung. Dabei wurde gezeigt, dass häufig kleine umschriebene Fibroseareale (fibrotische Mikrofoci) vorliegen und dass die automatisierte, künstliche Intelligenz (KI)-gestützte Fibroseanalyse mit Generierung eines durchschnittlichen CIF-Scores insbesondere in schwierigen Fällen in der Differentialdiagnose präPMF versus ET hilfreich sein könnte. Abbildung 9 zeigt die Variabilität des Ausprägungsgrades innerhalb von KM-Biopsien und die mittels Computer generierte Modellierung und Visualisierung [50].



**Abbildung 9: Variabilität der Retikulinfaserfibrose innerhalb von Knochenmarkbiopsien.** A Radarplots zeigen den durchschnittlichen CIF-Wert, die Verteilung der Kacheln über die vier „Bins“ und die Heterogenität der Kachelverteilung. Beispiele für homogene und heterogene Fibrosemuster. B Beispiele für Radarplots für reaktive Proben und MPN-Fälle. [50] <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

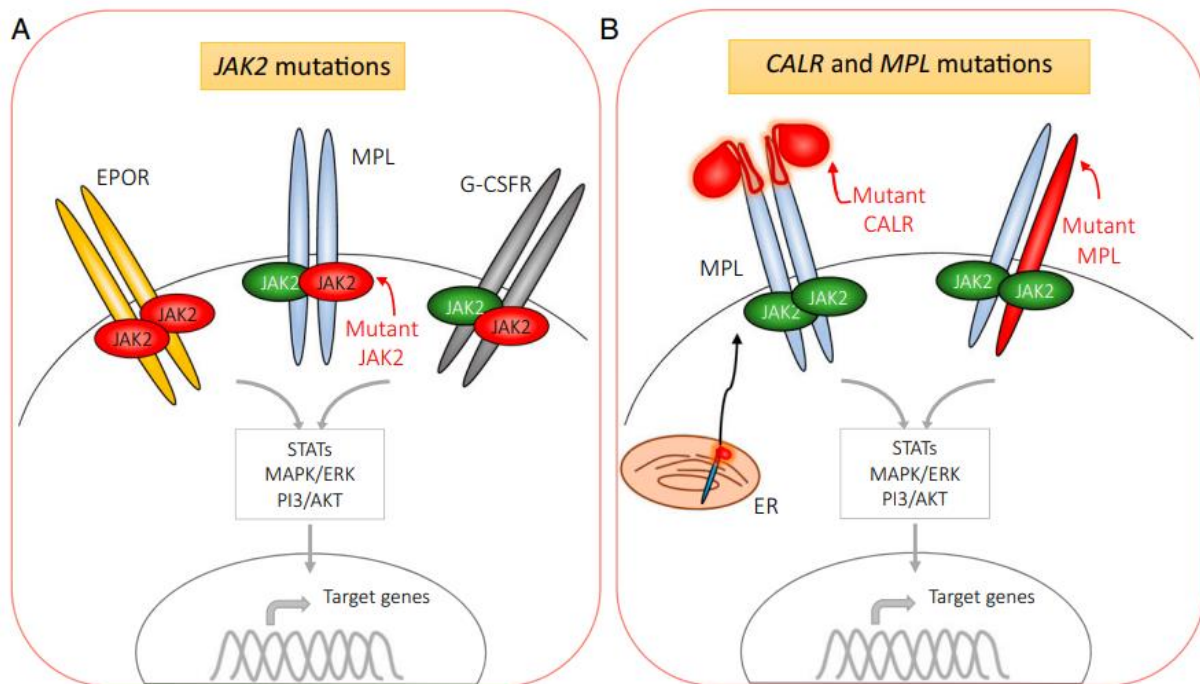
Die Pathogenese der Myelofibrose steht in engem Zusammenhang mit einem Zustand chronischer Entzündung und Alteration der Knochenmarknische, die auf eine komplexe zelluläre und molekulare Interaktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Rezente wissenschaftliche Daten weisen darauf hin, dass der Zustand der Inflammation im Stroma neben der JAK2-Inhibition einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt in MPN darstellt [51,52].

## 2.4. Molekulargenetik

Die aberrante Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade über EPOR und/oder MPL ist der zentrale pathogenetische Mechanismus der *BCR::ABL1*-negativen MPN, unabhängig von der Art der Driver-Mutation (*JAK2*, *CALR*, *MPL*). Es kommt zu einer



Dimerisierung von JAK2 und folglich konstitutiven Aktivierung von JAK2 (Abbildung 10 A und B) [14].



**Abbildung 10: Mutationen in JAK2, CALR, MPL führen zu exzessiver Myeloproliferation über konstitutive Aktivierung JAK2 nachgeschalteter Signalwege [14]**

### 2.4.1. JAK2

Die Beschreibung der *JAK2* V617F-Mutation im Jahr 2005 läutete eine neue Ära in Hinblick auf die molekulare Klassifikation von MPN und Entwicklung therapeutischer Strategien ein. *JAK2* ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, der eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von mehreren Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EPOR, MPL, G-CSF-R) zukommt. Die Substitution einer einzigen Base (Punktmutation) innerhalb der JH2-Pseudokinase-Domäne im Exon 14 des *JAK2*-Gens führt zum Austausch der hochkonservierten Aminosäure Valin an Position 617 zu Phenylalanin und in der Konsequenz zu einer konstitutiven Tyrosinkinase-Aktivität und Aktivierung der JAK-STAT-Signalkaskade (Abbildung 11). Die Mutation ist erworben und häufiger heterozygot als homozygot. Im Falle einer homozygoten Mutation zeigt sich nicht selten ein Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity = LOH) auf Chromosom 9p, der auf eine Duplikation des mutierten Allels (mitotische Rekombination) zurückzuführen ist (copy neutral LOH bzw. acquired uniparentale Disomie = aUPD). Die homozygote *JAK2*- Mutation äußert sich im klinischen Phänotyp durch eine betonte Erythrozytose



[53,54]. Die *JAK2* V617F-Mutation war in Studien der Erstbeschreibung in zwischen 35 und 57% der PMF-Patient\*innen zu finden [54–57].

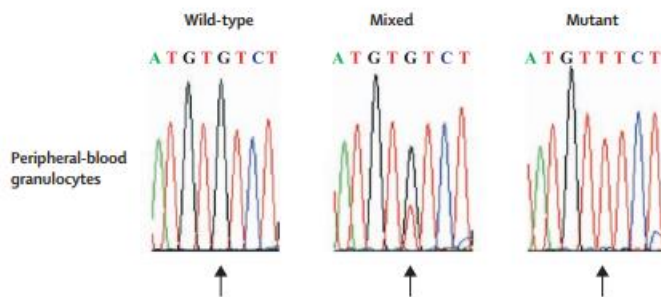


Abbildung 11: Wild-Typ-Sequenz und G→T Mutation im *JAK2*-Gen [55]

Die Höhe der *JAK2*-Mutationslast (> versus < 50% VAF) hat sich unter *JAK2*-mutierten ET- und präPMF- Fällen neben der Knochenmarkhistologie als unabhängiger prognostischer Risikofaktor für eine Transformation in eine manifeste Myelofibrose erwiesen [58].

Die weitaus seltenere „gain-of-function“- Mutation im Exon 12 des *JAK2*-Gens ist nur in der PV, nicht aber in anderen MPN-Entitäten wie der präPMF beschrieben und geht mit einer isolierten Erythrozytose einher ohne Alteration von Granulo- und Megakaryopoese [59].

#### 2.4.2. *MPL*

Die weitere molekulargenetische Abklärung *JAK2* V617-negativer PMF-Fälle führte zur Erstbeschreibung der *MPL*-Mutation im Jahr 2006. Sequenziert wurden die Transmembran- und Juxtamembran- Domänen der homodimeren Typ I Zytokin-Rezeptoren EPOR, *MPL* und GCSF-R. Während sich keine Mutationen in EPOR und GCSF-R fanden, konnte eine somatische pathogene Mutationen in der Transmembranregion des Thrombopoietin- Rezeptors *MPL* identifiziert werden. Im Nukleotid 1544 (Exon 10) wird die Base Guanin durch Thymin ersetzt, resultierend in einem Austausch von Tryptophan zu Leucin im Codon 515 (*MPL* W515L) (Abbildung 12). Diese *MPL*-Mutation wurde in 4 von 45 Patient\*innen mit PMF erstbeschrieben. Histologisch geht damit eine betonte Hyperplasie der Megakaryopoese einher [60].

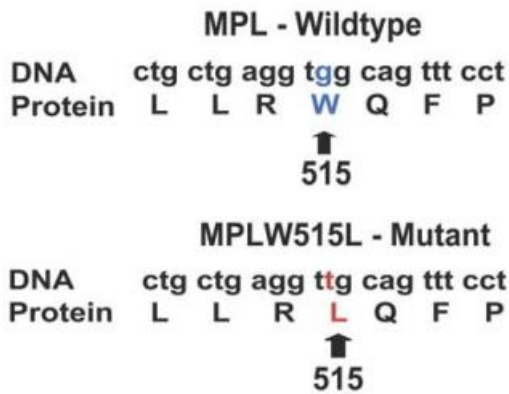


Abbildung 12: **DNA-Sequenz und Protein-Translation für Wild-Typ- und mutierte MPL-Allele.** Die Mutation führt zu einer Substitution von Tryptophan durch Leucin am Codon 515. [60] <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

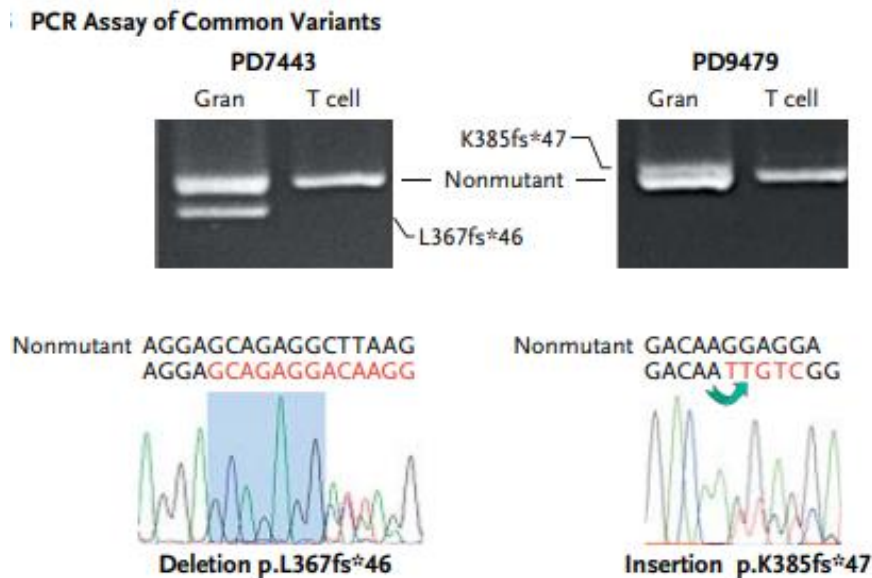
Die Signalkaskade erfolgt über eine Phosphorylierung von MPL und JAK2/TYK2 und in weiterer Folge Aktivierung des STAT 3, STAT 5, ERK/MAPK und PI3K/AKT Signalwegs (wie in Abbildung 1 und 10 dargestellt).

In einer größeren Serie von 1182 Patient\*innen wurde die *MPL* W515L Mutation auch in ET-, nicht aber PV-Fällen gefunden, ferner auch noch eine andere *MPL*-Mutation beschrieben (*MPL* W515K) und zudem einzelne wenige Fälle mit *MPL* W515L und gleichzeitiger *JAK2* V617F identifiziert. Letztere zeigten eine deutlich höhere *MPL*- als *JAK2*-Allelfrequenz, wobei unklar blieb, ob es sich um zwei unabhängige Klone oder aber um einen Subklon der *MPL*-Mutationstragenden Progenitorzelle handelte [61].

### 2.4.3. Calretikulin

Die Pathogenese von MPN ohne nachgewiesener *JAK2*- oder *MPL*-Mutation blieb unklar, bis es im Jahr 2013 gelang, Mutationen im *CALR*-Gen zu beschreiben. Bis dahin war *CALR* nicht als Onkogen bekannt. *CALR* stellt ein hochkonserviertes Protein innerhalb des endoplasmatischen Retikulums dar, das als Chaperon fungiert [62]. Mutationen konnten in 70-84% der *JAK2*-unmutierten MPN-Fälle, nicht aber in PV, gefunden werden. Sie betreffen das Exon 9, wobei sich zwei häufige Varianten zeigten: eine 52-bp Deletion (L367fs\*46) und eine 5-bp Insertion (K385fs\*47). Die Insertion stellt eine inverse Duplikation der 5 Nukleotide vor der Insertion dar (siehe Abbildung 13). Bei allen *CALR*-Varianten handelt es sich um "Frameshift-Mutationen"

mit Verschiebung des Leserasters um +1 Basenpaar. *CALR*- Mutationen treten ausschließlich in *JAK2*- und *MPL*- unmutierten Fällen auf [63].



**Abbildung 13: Ergebnisse der PCR und Sanger-Sequenzierung der beiden häufigsten *CALR*-Varianten [63]**

Klinisch zeigten *CALR*-mutierte PMF in Studien eine niedrigere Leukozyten-, eine höhere Thrombozytenzahl, ein niedrigeres Thromboserisiko und ein höheres Gesamtüberleben als PMF-Patient\*innen mit *JAK2*-Mutation. Patient\*innen mit *CALR*-mutierter PMF waren signifikant jünger (medianer Krankheitsbeginn mit 50 Jahren versus 63 bzw. 64 Jahren bei *JAK2* bzw. *MPL*-Mutation) und wiesen einen niedrigeren IPSS-Risikoscore auf. Quantitativ kommen *CALR*-Mutationen bei PMF mit etwa 23% am zweithäufigsten nach Mutationen im *JAK2*-Gen (knapp 65%) und vor Mutationen im *MPL*-Gen (4%) vor. 53-72% stellen Typ1 Mutationen (52bp Deletion) und 16-32% Typ 2 Mutationen (5bp Insertion) dar, 12-15% waren seltenere Insertionen-Deletionen. Typ 1 Deletionen erwiesen sich als signifikant häufiger in PMF als in ET [64,65].

Die Daten haben gezeigt, dass das bessere Gesamtüberleben nur mit der Typ 1 *CALR*-Mutation assoziiert ist, während Typ 2- Mutationen mit einem schlechteren Gesamtüberleben einher gehen [66].

Die quantitative Verteilung von *JAK2*-, *MPL*- und *CALR*-Mutationen in Philadelphia-negativen MPN ist in Abbildung 14 dargestellt.

Distribution of *JAK2*, *MPL*, and *CALR* Mutations in Philadelphia Chromosome–Negative Myeloproliferative Neoplasms

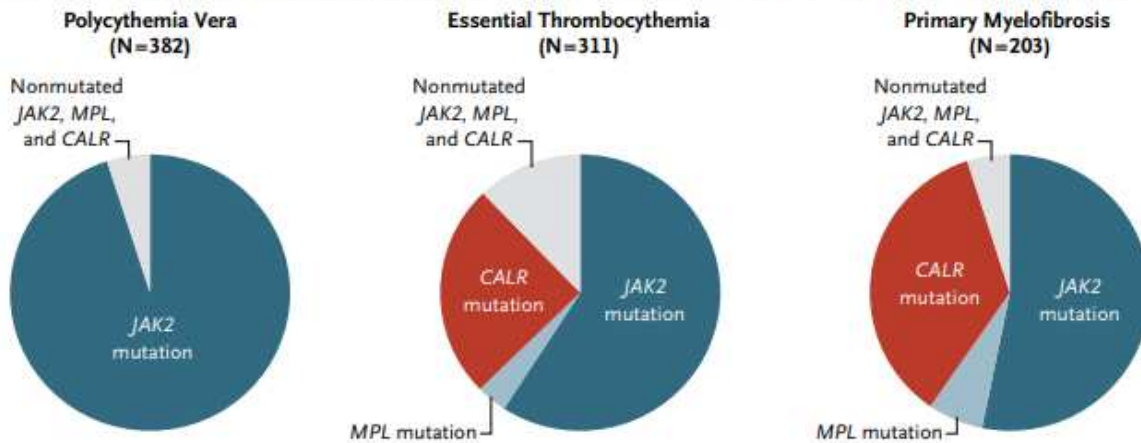


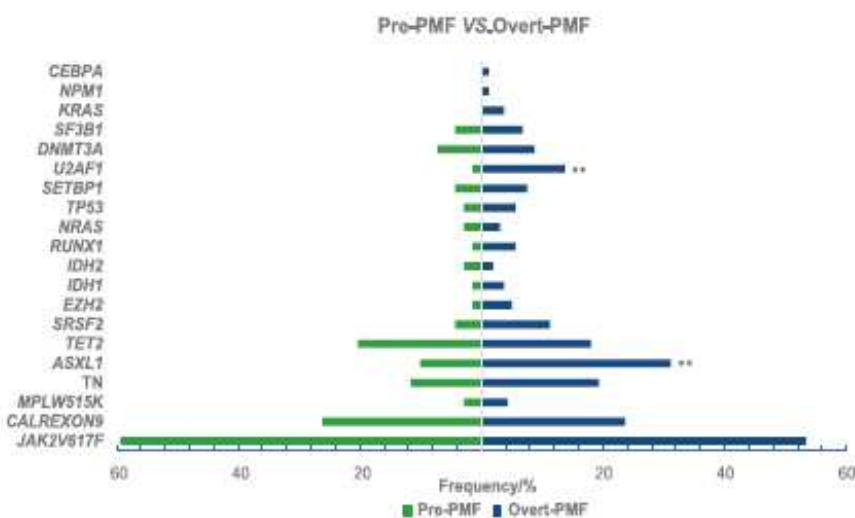
Abbildung 14: Häufigkeit der *CALR*-Mutationen in PV, ET und PMF. [64]

#### 2.4.4. Non-Driver Mutationen

In etwa 55% der Patient\*innen mit MPN [30] und knapp >80% der Patient\*innen mit PMF [67] treten zusätzliche, für die MPN nicht spezifische somatische Mutationen auf und betreffen Gene, die in Zusammenhang mit epigenetischer Regulation (DNA Methylierung, Histonmodifikation), Transkriptionsfaktoren und RNA-Splicing stehen. [23,29,32] (siehe auch Abbildung 3 und Tabelle 1). Von diesen werden Mutationen in den Genen *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2* und *U2AF1* Q157 als prognostisch ungünstig angesehen (Mutationen mit hohem, molekularem Risiko = HMR) [32,68,69]. HMR-Mutationen (isoliert und  $\geq 2$  HMR-Mutationen) kommen signifikant häufiger bei fortgeschrittener PMF als präPMF vor (44,4 vs. 27% für 1 Mutation und 13,6 vs. 5,4% für  $\geq 2$  Mutationen) [40]. Das Vorhandensein einer HMR-Mutation verkürzt das Gesamtüberleben sowie das Leukämiefreie Überleben bei Patient\*innen mit fortgeschrittener PMF als auch präPMF, was sich durch das Vorhandensein von mehr als einer HMR-Mutation verstärkt [33,40]. Im Rahmen der klinischen Phase III-Studie „COMFORT II“, die mit dem *JAK2*-Inhibitor Ruxolitinib therapierte Patient\*innen untersuchte, wurde dieser Einfluss auf das Gesamtüberleben prospektiv bestätigt [70]. *U2AF1*-Mutationen kommen signifikant häufiger bei *JAK2*-mutierter PMF vor, *SRSF2*-Mutationen sind bei *CALR*-mutierter PMF seltener [67].

Für *ASXL1*-Mutationen konnte gezeigt werden, dass diesen eine relevante Rolle im gesamten Verlauf der PMF zukommt, indem sie die Fibrosierung sowie die Blastenvermehrung fördern. *ASXL1*-Mutationen waren neben *U2AF1*-Mutationen

signifikant häufiger in fortgeschrittener PMF als in präPMF zu finden (siehe Abbildung 15), gleichermaßen waren sie neben *RUNX1*- und *NRAS*-Mutationen signifikant angereichert in Patient\*innen mit akzelerierter Phase/Blastenphase der PMF (PMF-AP/BP) verglichen mit fortgeschrittener PMF [71]. *ASXL1*-Mutationen sind gehäuft bei normalem Karyotyp vorhanden und behielten die prognostische Relevanz unabhängig vom DIPSS-plus Score [32]. Zielgerichtete Therapien wie BET (Bromodomain and Extraterminal domain)-, BAP1 (BRCA1-Associated Protein 1)- oder TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)-Inhibitoren könnten in Zukunft im Falle *ASXL1*-mutierter PMF zur Anwendung kommen [71].



**Abbildung 15: Assoziation zwischen Non-Driver Mutationen und Stadium der PMF. Vergleich der Mutationsfrequenzen zwischen präPMF und fortgeschrittener PMF [71]**  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## 2.5. Prognose und Therapie

Als Basis für therapeutische Entscheidungen, insbesondere in Hinblick auf die allogene Stammzelltransplantation - die bislang einzige potenziell kurative Therapieoption – werden klinische Prognosescores herangezogen, die in den letzten Jahren laufend adaptiert wurden. Der IPSS (International Prognostic Scoring System) basiert auf 5 Parametern (Alter > 65 Jahre, konstitutionelle Symptome, Hb-Wert < 10g/dl, Leukozytenzahl > 25 G/l, zirkulierende Blasten ≥ 1%) und unterscheidet vier prognostische Gruppen innerhalb der PMF (low risk, intermediate risk 1 und 2, high

risk), die sich signifikant im Überleben unterscheiden. Während das mediane Überleben für die niedrige Risikogruppe bei etwa 11 Jahren und die Hochrisikogruppe bei 2 Jahren liegt, ist dieses in den intermediären Risikogruppen mit etwa 8 bzw. 4 Jahren zu beziffern. Dieses Scoring System erlaubt eine Stratifizierung zum Zeitpunkt der Diagnose [72].

Der dynamische IPSS (DIPSS) berücksichtigt auch den Verlauf der Erkrankung und zeigte gleichermaßen statistisch signifikante Unterschiede in den genannten Risikogruppen. Der im Krankheitsverlauf auftretenden Anämie kommt in diesem Modell eine höhere prognostische Relevanz zu. Wird der DIPSS kombiniert mit ungünstigem Karyotyp (komplexer Karyotyp oder eine oder zwei der folgenden Aberrationen: +8, -7/7q,i(17q), -5/5q-,12p-,inv(3) oder 11q23 Rearrangement), Thrombozytenzahl  $< 100 \times 10^9/l$  und Transfusionsbedarf, ergibt sich der DIPSS plus. Die hier kombinierten einzelnen Parameter erwiesen sich als jeweils unabhängiger Risikofaktor für ein schlechteres Überleben [73].

Die beiden neueren Prognosescores MIPSS70 („mutation-enhanced“ IPSS) und MIPSS70+ („karyotype-enhanced“ MIPSS70) integrieren klinische Daten mit dem Fibrosegrad im KM ( $\geq 2$ ) und molekularen Parametern (Nachweis von HMR-Mutationen und Fehlen von *CALR* Typ 1 Mutation), für den MIPSS70+ sind es etwas weniger klinische Daten, jedoch zusätzlich zytogenetische Parameter. Sie sind speziell für Patient\*innen im Transplantationsalter vorgesehen [69].

Zu den HMR- Mutationen wurde später auch die pathogene Mutation *U2AF1* Q157, nicht aber *U2AF1* S34, gezählt, die bei PMF mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben, einer Thrombopenie und Anämie sowie höherem Patient\*innenalter assoziiert ist [74]. Diese *U2AF1* Q157 Mutation wurde als weitere HMR- Mutation in die MIPSS70+ Version 02 integriert [75]. Sie kommt in 11 - 16% der PMF- Fälle vor [75,76].

Im Jahr 2018 wurde ein ausschließlich auf genetischen Daten basierender Score entworfen (GIPSS, „genetically-inspired“ IPSS), der neben Driver-Mutationen und HMR-Mutationen vor allem auch die Zytogenetik stark gewichtet. Bezüglich der Vorhersagegenauigkeit war dieser Score vergleichbar mit dem MIPSS70+ [31].

Ein auf künstlicher Intelligenz (KI) bzw. maschinellem Lernen basierender Score, der AIPSS-MF („Artificial Intelligence Prognostic Scoring System for Myelofibrosis“), wurde von einer Spanischen Forschergruppe modelliert und fußt auf Basisinformationen von über 1300 Patient\*innen aus 60 spanischen Institutionen. Als individualisierter Score

hat seine Vorhersage jene von IPSS als auch DIPSS übertroffen. Einschränkend ist jedoch der fehlende Bezug zu genetischen Daten anzumerken [77].

Die genannten Prognosescores wurden für die fortgeschrittene PMF definiert, mit Ausnahme des IPSS wurden sie nicht separat für die präPMF validiert [78]. Für den IPSS konnte jedenfalls bestätigt werden, dass dieser Score auch bei Patient\*innen mit präPMF prädiktiv eingesetzt werden kann, eine genaue Unterscheidung zwischen den „intermediate-risk“ Gruppen 1 und 2 gelang jedoch nicht [40].

Für asymptomatische Patient\*innen mit präPMF in der „low-risk“ Gruppe wird eine alleinige Observanz empfohlen [79]. Allerdings konnte an einer kleinen Kohorte gezeigt werden, dass eine frühe Behandlung mit rekombinantem Interferon alpha (rIFN $\alpha$ ) bei Patient\*innen ohne HMR- Mutationen in der „low risk“- und intermediären Gruppe 1 die Entwicklung einer ausgeprägten Splenomegalie, Anämie und manifesten Myelofibrose verzögern kann. Die Art der Driver-Mutation spielte hier keine Rolle, jedoch unterstreichen die Studienergebnisse die Wichtigkeit der molekularen Profilierung zum Zeitpunkt der Diagnose, da das Vorhandensein von HMR- Mutationen einen prädiktiven Parameter für das Therapieansprechen darstellte [80]. Derzeit wird die rIFN $\alpha$ -Therapie als „off-label“ Option angeführt [81]. Patient\*innen mit intermediärem Risiko benötigen möglicherweise eine palliative Therapie für Anämie, Splenomegalie oder konstitutionelle Symptome. Ruxolitinib sollte bei intermediärem und hohem Risiko bei behandlungsbedürftiger Splenomegalie und systemischen Symptomen in Betracht gezogen werden [82,83]. Sollte nur eine zytoreduktive Therapie zur Verbesserung der Leukozytose oder Thrombozytose angezeigt sein, ist das Mittel der ersten Wahl Hydroxyurea [79]. Laut ELN-Empfehlung sollte bei Vorliegen einer refraktären, transfusionspflichtigen Anämie, >2% Blasten im PB, Vorliegen einer Hochrisikozytogenetik, bei Triple-negativer MF oder *ASXL1*-Mutation bereits in der Gruppe mit intermediärem Risiko 1 eine allogene Stammzelltransplantation (AlloSZT) in Betracht gezogen werden [84]. Eine Langzeit-Therapie mit Ruxolitinib hat möglicherweise ein gewisses Potential für eine Krankheitsmodifikation, in dem es die zunehmende Fibrosierung verzögert oder gar reduziert. In dieser Studie waren PMF-Patient\*innen mit MF 1-3 vertreten, eine getrennte Auswertung für die präPMF Patient\*innen erfolgte allerdings nicht [85]. Für die Hochrisikogruppe unter den präPMF Patient\*innen, die etwa 12% ausmacht, ist das mediane Überleben mit <5 Jahren vergleichbar mit der Hochrisikogruppe der



fortgeschrittenen PMF, sodass eine intensiviertere Therapie, wie auch allogene Stammzelltransplantation in Frage kommt [40,78].

Ein empfohlener Therapie-Algorithmus für die fortgeschrittene PMF in Abhängigkeit vom MIPSS v2-Score ist in Abbildung 16 angeführt.

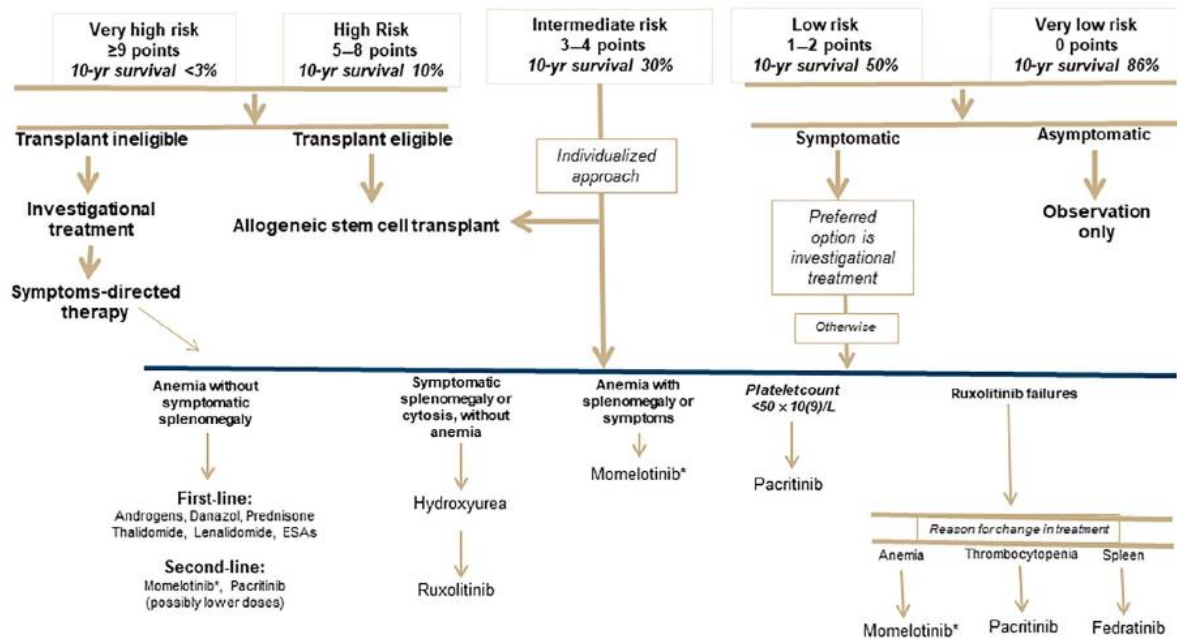


Abbildung 16: Risikoangepasster Behandlungsansatz bei primärer Myelofibrose unter Verwendung des MIPSS v2. [86]

### 3. Hypothese

Zusätzliche Non-Driver Mutationen, vor allem in HMR-Genen, sind eher assoziiert mit einem höheren Fibrosegrad. Die Ausprägung der Hyperplasie der Megakaryopoese ist eher abhängig von der Art der Driver-Mutation. Die Morphologie der Megakaryozyten im Sinne der Lagerung in (lockeren oder dichten) Clustern steht in Zusammenhang mit dem Vorhandensein oder Fehlen einer Non-Driver Mutation.



## 4. Methoden

### 4.1. Datenerhebung und Parameter

In diese monozentrische retrospektive Studie wurden Patient\*innen eingeschlossen, bei denen im Zeitraum zwischen 01/2013 und 11/2020 am Ordensklinikum Linz Elisabethinen mittels Knochenmarkbiopsie unter Einbezug der Molekulargenetik (Nachweis einer Driver-Mutation im *JAK2*- oder *CALR*- Gen) die Diagnose einer präPMF nach WHO-Kriterien 2016 gestellt wurde und die Knochenmarkbiopsie zur Reevaluation verfügbar war. Die Patient\*innen erhielten über zumindest 6 Monate ab Diagnose eine Interferontherapie. Eingeschlossen wurden insgesamt 29 Patient\*innen.

Die Daten wurden aus der elektronischen Krankenakte der Patient\*innen entnommen und in eine Excel-Tabelle pseudonymisiert eingetragen, wobei dieses Vorgehen am Ordensklinikum Linz mit Standort Barmherzige Schwestern, Institut für klinische Pathologie und Molekularpathologie erfolgte. Als Zeitpunkt der Erstdiagnose (ED) der MPN wurde das Datum der ersten diagnostischen Knochenmarkbiopsie gewählt. Die Diagnose wurde anhand der aktuell gültigen WHO-Kriterien 2016 nochmals geprüft und die archivierten histologischen Schnitte von der Erstdiagnose und den Kontrollen im Verlauf erneut mikroskopiert und reevaluiert. Als Hauptzielgrößen wurde die Retikulinfaserfibrose, die Gesamtzellularität und die Zellularität sowie die Clusterbildung innerhalb der Megakaryopoese erhoben. Die Art der Driver-Mutation und das Vorhandensein zusätzlicher Non-Driver Mutationen wurde anhand geeigneter molekulargenetischer Methoden (PCR und NGS) im Labor für Molekulargenetische Diagnostik, Standort Ordensklinikum Linz Barmherzige Schwestern ermittelt. Zum Teil wurden ausständige molekulargenetische Daten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose anhand von bereits vorhandenen und noch verfügbaren Blut- oder KM-Proben nachbestimmt. Für das Alter der Patient\*innen wurde der Median [Range] angegeben.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Land Oberösterreich bestätigt und ist im Einklang mit der Deklaration von Helsinki 1975 (Ethikvotum: 1283/2023).

## 4.2. Molekulargenetik

Bei insgesamt 20 Patient\*innen erfolgte eine NGS-Untersuchung. Bei 12 Patient\*innen erfolgte diese vor Therapiebeginn zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, 8 Patient\*innen erhielten sie erstmals im späteren Verlauf (Median 95 Monate nach Diagnosestellung, Range 12-173 Monate). Für die Auswertung der beiden Kohorten (mit oder ohne Non-Driver Mutation) wurden auch 4 für eine Non-Driver Mutation negative Patient\*innen und ein Patient\*in mit einer *NOTCH1*-Mutation unklarer Bedeutung inkludiert, deren erstmalige NGS-Untersuchung erst nach Diagnosestellung erfolgte. Die Rationale dahinter war die Annahme, dass Non-Driver Mutationen unter Interferon nicht gänzlich verschwunden wären und es sich bei der *NOTCH1*-Variante um eine nicht krankheitsrelevante Keimbahnvariante handelte.

An Proben aus dem peripheren Blut oder Knochenmarkaspirat wurde die Driver-Mutation (*CALR* oder *JAK2*) nachgewiesen. Für die *JAK2* V617F-Mutation im Exon 14 kam die quantitative PCR (qPCR) zur Anwendung. Mit dieser Allel-spezifischen TaqMan real-time PCR werden die Wildtyp und mutierten DNA-Sequenzen mit einer Sensitivität von 0,0001% quantifiziert, wobei der Zahlenwert die Allel-Ratio mutiert zu wildtyp in % beschreibt. Eine Allel-Ratio von <0,0001% galt somit als negativ. Bei der *CALR*-Mutation wurden zwei Mutationsarten im Exon 9 differenziert (Typ I entsprechend einer 52bp Deletion und Typ II entsprechend einer 5bp Insertion) und mittels PCR mit einer Sensitivität von 1% detektiert. Eine Allel-Ratio <1% wurde als negativ klassifiziert. Bei dieser Nachweismethode wird die Hotspot-Region mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Kapillar-Gelelektrophorese ausgewertet. Das quantitative Verhältnis zwischen mutierter und Wildtyp-Bande wird durch Vergleich der AUC („Area Under the Curve“) der Spitzenwerte („Peaks“) bestimmt.

Nach Möglichkeit wurde das Vorhandensein zusätzlicher Non-Driver Mutationen mit einem myeloischen NGS „Cancer Panel“ abgeklärt. Dieses NGS-Panel beinhaltet 39 Gene, wobei bei den Genen *BCOR*, *CEBPA*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *EZH2*, *JAK2*, *NF1*, *RUNX1*, *STAG2*, *TET2*, *TP53*, *ZRSR2* die kodierende Sequenz vollständig abgedeckt ist, bei den Genen *ABL1*, *ASXL1*, *BIRC3*, *BRAF*, *BTK*, *CALR*, *CBL*, *CXCR4*, *FLT3*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *MYD88*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PLCG2*, *PTPN11*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *WT1* nur die Hotspots erfasst sind. Erfasst werden Punktmutationen sowie kleine Insertionen/Deletionen in den abgedeckten Target-Bereichen. Die „Library Preparation“ erfolgte mittels "Myeloid

Solution MOKL-v3" (Sophia- Genetics). Die Sequenzierung wurde am „MiSeq™ System“ von Illumina durchgeführt. Als Cut-off für Mutationen galt 1% für „variante Reads“, in manchen Regionen aus technischen Gründen 5%.

### 4.3. Histologie

Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Knochenmarkbiopsien waren für alle 29 Patient\*innen vom Zeitpunkt der Erstdiagnose verfügbar. Sämtliche vorhandene Schnitte, zumindest aber jeweils die HE- und die NACE-Färbung, die Versilberung nach Gomori und je eine Immunhistochemie mit Antikörper gegen CD42b (Darstellung der Megakaryopoese) und gegen CD71 (Darstellung der Erythropoese) wurden für jeden Fall pseudonymisiert und in Bezug auf klinische und molekulargenetische Daten verblindet reevaluiert. Anhand der HE- und NACE-Färbung wurde nochmals die typische Histomorphologie der präPMF mit gesteigerter Granulopoese überprüft, anhand der CD71-Immunhistochemie die verhältnismäßig reduzierte Erythropoese dargestellt. Die Gesamtzellularität wurde anhand der HE-Färbung in altersbezogen gering-, mittel- und hochgradige Hyperzellularität eingeteilt. Die Versilberung nach Gomori diente zur Graduierung der Myelofibrose in einer Skala von 0 bis 1 gemäß den europäischen Konsensuskriterien [19]. Die Megakaryopoese wurde mittels CD42b-Immunhistochemie evaluiert und mit mittel- oder hochgradig hyperplastisch bewertet, zusätzlich die Tendenz zur Ausbildung von lockeren, dichten oder gemischten, lockeren und dichten, Clustern notiert.

### 4.4. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde in Python durchgeführt unter Verwendung der Open Source-Software SciPy v1.10.1 und des Moduls SciPy.stats.

Im Fall von nominalen Parametern mit zwei Ausprägungen (dichotome Parameter) wurde der Exakte Test nach Fisher, für alle anderen (mit mehr Ausprägungen) der Chi-Quadrat-Test angewandt.

Für die Korrelationsanalysen wurden für Zusammenhänge zwischen histomorphologischen Parametern und molekularen Markern (rein nominelle Variablen) Kontingenzkoeffizienten (Cramers V, Tschuprow T, Pearson) berechnet.

Es erfolgte keine Adjustierung des Alphafehlerniveaus für multiples Testen, somit sind sämtliche statistischen Aussagen rein deskriptiv. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Patient\*innenkollektiv

In dem 29 Patient\*innen umfassenden Kollektiv waren 14 weiblich (48,3%) und 15 männlich (51,7%) mit einem Geburtsjahr zwischen 1939 und 1989. Das mediane Alter bei Erstdiagnose (ED) lag bei 55,07 Jahren, die jüngste Patient\*in war 23,2, die älteste 74,89 Jahre.

Fünfzehn Patient\*innen (51,7%) waren *JAK2* V617F-mutiert, 14 *CALR*-mutiert (48,3%), Patient\*innen mit *MPL*-Mutation oder „triple-negative“ Fälle waren in dem Kollektiv ausgeschlossen, da hier keine PCR zur Verlaufsbestimmung des molekularen Ansprechens verfügbar war. Die *CALR* Typ1 Mutation (52bp Deletion) war mit 10/14 Fällen (71%) häufiger als die *CALR* Typ2 Mutation (5bp Insertion) (siehe Abbildung 17).

Eine NGS-Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war bei 12 Patient\*innen verfügbar (41,4%), im Verlauf der Erkrankung erfolgte bei 13 Patient\*innen (44,8%) eine (erstmalige oder erneute) NGS-Testung, die zwischen 16 und 163 Monaten nach Erstdiagnose erfolgte. Doppel- oder Mehrfachtestungen mittels NGS erfolgten bei 5 Patient\*innen (17,2%). Von 17 Patient\*innen (58,6%) war kein NGS zum Zeitpunkt der ED verfügbar, in 8 Fällen davon erfolgte jedoch eine NGS-Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt, von denen 4 keine zusätzlichen Non-Driver Mutationen zeigten. Eine zeigte eine vermutlich nicht relevante Keimbahnvariante im *NOTCH1*-Gen. Von 9 Patient\*innen war zu keinem Zeitpunkt eine NGS-Untersuchung verfügbar.

Insgesamt konnte bei 13 von gesamt 20 NGS- getesteten Patient\*innen (65%) eine oder mehrere Non-Driver Mutationen nachgewiesen werden, die 8 verschiedene Gene umfassten (*ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *NF1*, *RUNX1*, *TET2*, *ZRSR2*). *TET2*-Mutationen stellten mit 6 betroffene Patient\*innen die häufigste Non-Driver Mutation dar, wobei es sich um stets unterschiedliche Varianten handelte, die zumeist

pathogene Frameshift- oder Nonsense-Mutationen darstellten. Bei einer Person waren zwei unterschiedliche *TET2*-Varianten zu finden. Drei Patient\*innen wiesen *DNMT3A*-Mutationen auf, die übrigen Gene waren bei je einer Person mutiert, *ASXL1* war mit zwei Varianten bei einer Person vertreten. Bei zwei Patient\*innen zeigten sich Ko-Mutationen in jeweils zwei verschiedenen Genen.

Von den 12 bei ED getesteten Personen wiesen 8 (66,7%) eine Non-Driver Mutation auf. Schließt man auch die erstmals im Verlauf für eine Non-Driver Mutation getestete und negative Patient\*innen mit ein, so wurden 8/17 (47,1%) mit zusätzlicher Non-Driver Mutation und 9/17 (52,9%) mit alleiniger Driver-Mutation diagnostiziert. Drei Patient\*innen wurden mit einer Non-Driver Mutation im Verlauf diagnostiziert, bei denen jedoch offenbleiben musste, ob diese bereits zum Erkrankungsbeginn vorhanden war oder aber erst im Verlauf akquiriert wurde. Zwei dieser drei Patient\*innen wiesen je zwei pathogene Non-Driver Mutationen (2x*ASXL1* bzw. *TET2* und *DNMT3A*) auf und erlitten einen Krankheitsprogress mit Übergang in eine fibrotische PMF, beide Patient\*innen wiesen eine *CALR* Typ1 Driver-Mutation auf. Zwei Patient\*innen, bei denen bei ED noch keine Non-Driver Mutation nachzuweisen war, zeigten im Verlauf eine solche im Sinne eines somatischen Zugewinns bzw. Entwicklung eines Subklons.

Bezüglich der histomorphologischen Veränderungen im Knochenmark bei ED waren 18 Patient\*innen (62,1%) frei von jeglicher Fibrose (Retikulinfaserfibrose Grad 0 = MF 0), 11 Fälle (37,9%) wurden als geringe diffuse Retikulinfaserfibrose Grad 1 = MF 1 klassifiziert. Die meisten Patient\*innen waren mittelgradig hyperzellulär (n=20 bzw. 69%), wenige hochgradig (n=6 bzw. 20,7%) und einzelne (n=3 bzw. 10,3%) geringgradig hyperzellulär. Eine hochgradige Hyperplasie der Megakaryopoese war bei 9 (31%) und eine mittelgradige bei 20 Patient\*innen (69%) zu erkennen. Die Megakaryozyten tendierten in den meisten Fällen zur Ausbildung von gemischten, lockeren und dichten Clustern (n=22 bzw. 55,2%), 6 Patient\*innen (20,7%) hatten ausschließlich dichte und 7 Patientinnen ausschließlich lockere Cluster (24,1%). Von 16 Patient\*innen lagen sequenzielle KM-Biopsien vor, von denen im Beobachtungszeitraum vier eine Krankheitsprogression mit Übergang in eine fortgeschrittene PMF entwickelten (höhergradige Fibrose im Krankheitsverlauf). Drei dieser vier Patient\*innen wiesen sehr zellreiche, vorwiegend dichte Cluster bei

Erstdiagnose auf, was den Stellenwert der megakaryozytären Proliferation bei der Fibrosebildung unterstreicht.

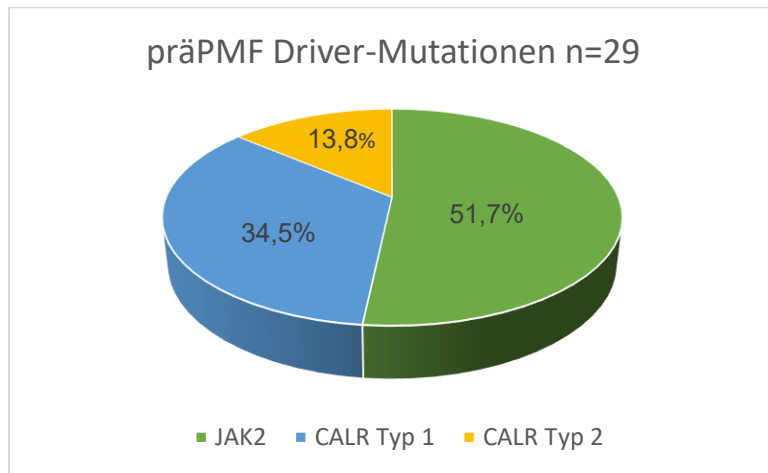


Abbildung 17: Anteil der unterschiedlichen Driver- Mutationen im Gesamtkollektiv

In Tabelle 5 sind die Charakteristika der Patient\*innen bei ED mit den entsprechenden molekulargenetischen und histomorphologischen Parametern zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5: Patient\*innencharakteristika bei Erstdiagnose

Gesamtkollektiv	n=29 (%)
Männlich / weiblich	15/14 (51,7/48,3)
Alter, Median [Range]	55,07 [23,2-74,89]
JAK2	15 (51,7)
CALR	14 (48,3)
CALR Typ1	10 (34,5)
CALR Typ2	4 (13,8)
Non-Driver Mutation (NGS bei 20)	13 von 20 (65)
HMR-Varianten	2 (10)
Fibrosegrad	
MF 0	18 (62,1)
MF 1	11 (37,9)

Hyperzellularität	
hochgradig	6 (20,7)
mittelgradig	20 (69)
geringgradig	3 (10,3)
Hyperplasie der Megakaryopoese	
hochgradig	9 (31)
mittelgradig	20 (69)
Cluster in der Megakaryopoese	
dicht	6 (20,7)
locker	7 (24,1)
locker & dicht	16 (55,2)

*CALR* (Calretikulin), *JAK2* (Januskinase 2), *HMR* (hohes molekulares Risiko), *MF* (Myelofibrose)

## 5.2. Spektrum molekulargenetischer Mutationen

Bei der Driver-Mutation im *JAK2*-Gen handelte es sich in unserem Kollektiv ausschließlich um die pathogene Hotspot Mutation c.1849G>T mit Aminosäureänderung p.(Val617Phe), die Allelfrequenzen lagen bei ED median bei 8,7% (Range 3,1-31%). Die Varianten im *CALR*-Gen stellten die beiden in der Fachliteratur am häufigsten beschriebenen pathogenen Hotspot-Mutationen im Exon 9 dar, c.1099\_1150del mit Aminosäureänderung p.(Leu367ThrfsTer46) (Typ 1) mit einer medianen VAF von 21,5% (Range 2,2-35%) sowie c.1155\_1156insTGTCG mit Aminosäureänderung p.Glu386Cysfs\*46 (Typ 2) und einer medianen VAF von 20% (Range 12- 27%).

Sämtliche im Beobachtungszeitraum nachgewiesene Non-Driver Mutationen - mit Ausnahme der vermutlich nicht relevanten Keimbahnvariante im *NOTCH1*-Gen - sind mit genauer Beschreibung der Variante in der kodierenden Sequenz, der Aminosäureänderung auf Proteinebene und der Allelfrequenz in Tabelle 6 aufgelistet. Wenn nicht anders angeführt handelt es sich um pathogene Varianten. Bei den ersten 8 angeführten Fällen waren die Mutationen bei ED nachzuweisen, die folgenden drei Fälle wurden 54 bis 163 Monate nach ED identifiziert (ohne verfügbarem NGS bei ED), die letzten beiden stellen neue, im Verlauf akquirierte Mutationen dar.

**Tabelle 6: Charakterisierung der somatischen Non-Driver Mutationen im Gesamtkollektiv**

Pat.ID	Gen	Variante	Aminosäureänderung	VAF %	Art und Interpretation
ID 4	ZRSR2	c.872G>A	p.(Trp291*)	56,8	non sense
ID 5	DNMT3A	c.886G>T	p.(Val296Leu)	29	wahrscheinlich pathogen
ID 6	NF1	c.1721+1G>A	nicht codierend	2,4	splice site Region
ID 9	TET2 TET2	c.1279_1282del c.4609C>T	p.(Asn427ValfsTer4) p.(Gln1537Ter)	2,8 1,5	frameshift wahrscheinlich pathogen
ID 10	EZH2	c.2084C>T	p.(Ser695Leu)	2,9	wahrscheinlich pathogen
ID 13	TET2	c.4481C>G	p.Ser1494*	25,7	non sense
ID 17	TET2	c.1870del	p.(Thr624GlnfsTer15)	1,1	frameshift
ID 26	TET2	c.5274_5275dup	p.(Pro1759Hisfs*5)	2	frameshift
ID 12	ASXL1 ASXL1	c.1934dupG c.2468del	p.(Gly646TrpfsTER12) p.(Leu823TER)	20,8 1,3	wahrscheinlich pathogen
ID 14	DNMT3A TET2	c.1238dupG c.5707del	p.(Phe414Leufs*7) p.(Gln1903Serfs*5)	2,4 2,4	frameshift frameshift
ID 20	TET2	c.5567_5579del	p..(Asp1856GlyfsTer27)	14,1	wahrscheinlich pathogen
ID 3	RUNX 1	c.619C>T	p.(Arg207Trp)	1,1	wahrscheinlich pathogen
ID 21	CBL DNMT3A	c.1151G>C c.2206C>T	p.(Cys384Ser) p.(Arg736Cys)	5,9 1,1	wahrscheinlich pathogen

ID (Identifikationsnummer), VAF (Variante Allelfrequenz), Pat. (Patient\*in), CALR (Calretikulin), JAK2 (Januskinase2)

ID 4, 5, 12, 20, 21: Driver-Mutation CALR Typ 1

ID 3, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 26: Driver-Mutation JAK2

ID 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17, 26: Non-Driver Mutationen bei Erstdiagnose (ED)

ID 12, 14, 20: Non-Driver Mutationen im Krankheitsverlauf, kein Next-Generation-Sequencing (NGS) bei ED

ID 3, 21: neu aufgetretene Non-Driver Mutation im Krankheitsverlauf, keine Non-Driver Mutation bei ED



### 5.3. Charakterisierung histologischer Parameter und Einfluss von Driver- und Non-Driver Mutationen auf das histomorphologische Bild

In Tabelle 7 sind die generellen und insbesondere histomorphologischen Charakteristika der beiden Kohorten (keine Non-Driver Mutation entsprechend Kohorte D versus nachgewiesene Non-Driver Mutation entsprechend Kohorte ND) gegenübergestellt.

Hierbei wird ersichtlich, dass das Patient\*innenalter bei ED in der Kohorte ND deutlich höher war als in der Kohorte D (Median 62,69 versus 47,77 Jahre). Bei einem p-Wert von 0,008 liegt ein bedeutsamer Unterschied vor, was bedeutet, dass die Nullhypothese (nämlich, dass das Alter von der Kohorte nicht beeinflusst wird) verworfen werden muss.

Eine geringgradige Fibrose (MF 1) war bei der Kohorte ND statistisch nicht bedeutsam häufiger zu beobachten als in der Kohorte D (25% vs. 11,1%, Odds Ratio OR = 2,66,  $p = 0,576$ ). Betrachtet man alle 20 Patient\*innen mit im gesamten Beobachtungszeitraum durchgeführtem NGS (also inklusive auch jener Patient\*innen, wo kein NGS bei Erstdiagnose, sondern erst später gemacht wurde) so fanden sich in der Gruppe ND (n=13) 9 Fälle mit MF 0 und 4 mit MF 1 und in der Gruppe D (n=7) 6 Fälle mit MF 0 und 1 Fall mit MF 1 (OR 2,66,  $p = 0,612$ ).

Eine hochgradige Hyperzellularität kam statistisch nicht bedeutsam häufiger in der Kohorte ND vor (2/8 Pat.), während eine nur geringgradige Hyperzellularität lediglich bei alleinigem Nachweis einer Driver-Mutation zu verzeichnen war (1/9 Pat.), ( $p = 0,319$ ).

Dichte Megakaryozyten-Cluster waren deutlich häufiger bei zusätzlicher Non-Driver Mutation zu finden im Vergleich zur Kohorte D (37,5 vs. 0%) ( $p = 0,084$ ).

Die Ausprägung der Hyperplasie der Megakaryopoese (mittel- oder hochgradig gesteigert) war nicht durch das Vorhandensein von Non-Driver Mutationen beeinflusst ( $p = 0,547$ ).

**Tabelle 7: Kohortenvergleich der histomorphologischen Parameter**

	Non- Driver Mutation		P-Wert
	nicht nachgewiesen	nachgewiesen	
	Kohorte D	Kohorte ND	
<b>Gesamt</b>	9 (52.9%)	8 (47.1%)	
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	5 (55.6%)	5 (62.5%)	0.457
männlich	4 (44.4%)	3 (37.5%)	
<b>Alter (Jahre)</b>			
Median [Range]	47.77 [30.67-68.87]	62.69 [52.92-70.87]	0.008
<b>Fibrose bei Erstdiagnose</b>			
0	8 (88.9%)	6 (75%)	0.576
1	1 (11.1%)	2 (25%)	
<b>Fibrose im Krankheitsverlauf</b>			
0	3 (33.3%)	1 (12.5%)	0.356
1	3 (33.3%)	1 (12.5%)	
2	1 (11.1%)	1 (12.5%)	
nicht untersucht	2 (22.2%)	5 (62.5%)	
<b>Hyperzellularität</b>			
gering	2 (22.2%)	0 (0.0%)	0.319
mittel	6 (66.7%)	6 (75%)	
hoch	1 (11.1%)	2 (25%)	
<b>Megakaryozyten Cluster</b>			
locker	3 (33.3%)	3 (37.5%)	0.084
gemischt	6 (66.7%)	2 (25%)	
dicht	0 (0.0%)	3 (37.5%)	
<b>Megakaryozyten Hyperplasie</b>			
mittel	7 (77.8%)	7 (87.5%)	0.547
hoch	2 (22.2%)	1 (12.5%)	
<b>Driver Mutation</b>			
JAK 2	4 (44.4%)	6 (75%)	0.365
CALR Typ1	4 (44.4%)	2 (25%)	
CALR Typ2	1 (11.1%)	0 (0.0%)	

D (Driver-Mutation), ND (Non-Driver Mutation), CALR (Calretikulिन), JAK2 (Januskinase 2)

Tabelle 8 zeigt die unterschiedlichen Non-Driver Mutationen in Bezug auf die Driver-Mutationen. Die häufigste Non-Driver Mutationen war mit 5 Fällen die *TET2*-Mutation bei *JAK2*-mutierter präPMF, während bei *CALR* Typ1 Mutationen die *DNMT3A*-Mutation mit zwei Fällen am häufigsten vorkam. Keine weitere somatische Mutation war bei dem einzigen NGS-getesteten *CALR* Typ2 mutierten Fall nachzuweisen. Die beiden nachgewiesenen HMR-Varianten (*ASXL1* und *EZH2*) waren bei je einer Patient\*in mit *JAK2* bzw. *CALR* Typ1 Mutation feststellbar.

**Tabelle 8: Somatische Non-Driver Mutationen in Bezug auf Driver-Mutationen**

Driver-Mutation	<i>TET2</i>	<i>EZH2</i>	<i>ZRSR2</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>ASXL1</i>	<i>CBL</i>	<i>RUNX1</i>	<i>NF1</i>
<b><i>JAK2</i> (n=15)</b>	5	1	0	1	0	0	1	1
<b><i>CALR</i> Typ1 (n=10)</b>	1	0	1	2	1	1	0	0
<b><i>CALR</i> Typ2 (n=4)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

*CALR* (Calretikulin), *JAK2* (Januskinase 2)

Tabellen 9.1 und 9.2 listen Patient\*innencharakteristika in Abhängigkeit von der Art der Driver-Mutation auf, erstere unter Gegenüberstellung von *CALR* und *JAK2*, zweite mit zusätzlicher Unterscheidung von *CALR* Typ1 und *CALR* Typ2 Mutationen.

Statistisch auffällig war das Ergebnis für einen Zusammenhang zwischen Hyperplasie der Megakaryopoese (mittel- versus hochgradige Hyperplasie) und den Driver-Mutationen *CALR* (bzw. *CALR* Typ1 und *CALR* Typ2) und *JAK2* ( $p=0,003$  bzw.  $0,009$ ). Eine mittelgradige Hyperplasie der Megakaryopoese war bedeutend häufiger bei *JAK2*-Mutation zu finden, im Gegensatz hierzu war eine hochgradige Hyperplasie auffällig häufiger bei *CALR*-Mutation und hier insbesondere bei *CALR* Typ2-Mutation zu finden.

*JAK2*-mutierte Fälle zeigten häufiger eine Assoziation mit Non-Driver Mutationen (40% vs. 14,3%) als *CALR*-mutierte; der Unterschied war aber statistisch nicht bedeutsam.

Eine geringgradigen Fibrose (Grad 1) bei Erstdiagnose zeigte sich häufiger bei Patient\*innen mit *CALR*-Mutation als bei Patient\*innen mit *JAK2*-Mutation (50% vs. 26,7%;  $p=0,196$ ). Drei der sieben Patient\*innen mit MF1 zeigten eine Non-Driver Mutation (*DNMT3A* bei Diagnose, *ASXL1* bzw. *TET2* im Verlauf). Bei den 4 anderen Fällen wurde keine NGS-Untersuchung durchgeführt.

Dichte Megakaryozyten-Cluster waren etwas häufiger bei *CALR*- als bei *JAK2*-Mutation zu finden, was aber statistisch nicht auffällig war (28,6 vs. 13,3%,  $p=0,599$ ).

**Tabelle 9.1: Krankheitscharakteristika in Abhängigkeit von der Art der Driver-Mutation (*CALR* vs. *JAK2*)**

	<b>CALR</b>	<b>JAK2</b>	<b>P-Wert</b>
<b>Gesamt</b>	14 (48.3%)	15 (51.7%)	
<b>Geschlecht</b>			
weiblich	6 (42.9%)	7 (46.7%)	0.837
männlich	8 (57.1%)	8 (53.3%)	
<b>Alter (Jahre), Median [Range]</b>	51.36 [23.2-73.33]	59.04 [41.89-74.89]	0.135
<b>Fibrose bei Erstdiagnose</b>			
0	7 (50.0%)	11 (73.3%)	0.196
1	7 (50.0%)	4 (26.7%)	
<b>Fibrose im Krankheitsverlauf</b>			
0	2 (14.3%)	2 (13.3%)	0.646
1	4 (28.6%)	4 (26.7%)	
2	3 (21.4%)	1 (6.7%)	
nicht untersucht	5 (35.7%)	8 (53.3%)	
<b>Zellularität</b>			
gering	1 (7.1%)	1 (6.7%)	0.993
mittel	10 (71.4%)	11 (73.3%)	
hoch	3 (21.4%)	3 (20.0%)	
<b>Megakaryozyten Cluster</b>			
locker	3 (21.4%)	4 (26.7%)	0.599
gemischt	7 (50.0%)	9 (60.0%)	
dicht	4 (28.6%)	2 (13.3%)	
<b>Megakaryozyten Hyperplasie</b>			
mittel	6 (42.9%)	14 (93.3%)	0.003
hoch	8 (57.1%)	1 (6.7%)	
<b>Non-Driver Mutation</b>			
nein	5 (35.7%)	4 (26.7%)	0.299
ja	2 (14.3%)	6 (40.0%)	
nicht untersucht	7 (50.0%)	5 (33.3%)	

*CALR* (Calretikulin), *JAK2* (Januskinase 2)

**Tabelle 9.2.: Krankheitscharakteristika in Abhängigkeit von der Driver-Mutation unter zusätzlicher Unterscheidung CALR Typ1 und CALR Typ2 Mutationen**

	CALR Typ 1	CALR Typ 2	JAK2	P-Wert
<b>Gesamt</b>	10 (34.5%)	4 (13.8%)	15 (51.7%)	
<b>Geschlecht</b>				
weiblich	5 (50.0%)	1 (25.0%)	7 (46.7%)	0.682
männlich	5 (50.0%)	3 (75.0%)	8 (53.3%)	
<b>Alter (Jahre), Median [Range]</b>	51.58 [23.20-73.33]	50.82 [32.58-68.19]	59.04 [41.89-74.89]	0.333
<b>Fibrose bei Erstdiagnose</b>				
0	4 (40.0%)	3 (75.0%)	11 (73.3%)	0.206
1	6 (60.0%)	1 (25.0%)	4 (26.7%)	
<b>Fibrose im Krankheitsverlauf</b>				
0	2 (20.0%)	0 (0.0%)	2 (13.3%)	0.390
1	3 (30.0%)	1 (25.0%)	4 (26.7%)	
2	3 (30.0%)	0 (0.0%)	1 (6.7%)	
nicht untersucht	2 (20.0%)	3 (75.0%)	8 (53.3%)	
<b>Zellularität</b>				
gering	1 (10.0%)	0 (0.0%)	1 (6.7%)	0.976
mittel	7 (70.0%)	3 (75.0%)	11 (73.3%)	
hoch	2 (20.0%)	1 (25.0%)	3 (20.0%)	
<b>Megakaryozyten Cluster</b>				
locker	3 (30.0%)	0 (0.0%)	4 (26.7%)	0.599
gemischt	4 (40.0%)	3 (75.0%)	9 (60.0%)	
dicht	3 (30.0%)	1 (25.0%)	2 (13.3%)	
<b>Megakaryozyten Hyperplasie</b>				
mittel	5 (50.0%)	1 (25.0%)	14 (93.3%)	0.009
hoch	5 (50.0%)	3 (75.0%)	1 (6.7%)	
<b>Non-Driver Mutation</b>				
nein	4 (40.0%)	1 (25.0%)	4 (26.7%)	0.422
ja	2 (20.0%)	0 (0.0%)	6 (40.0%)	
nicht untersucht	4 (40.0%)	3 (75.0%)	5 (33.3%)	

CALR (Calretikulin), JAK2 (Januskinase 2)

## 6. Diskussion

Das Hauptziel dieser Studie zur präPMF war, zu untersuchen, ob in einer nach WHO 2022 klassifizierten, gut charakterisierten Kohorte ein Zusammenhang zwischen dem Mutationsprofil (Driver-Mutation und Non-Driver Mutationen) und der Histomorphologie besteht. Grundsätzlich hat die NGS-Untersuchung in den letzten Jahren für eine fundierte Risiko- bzw. Prognoseabschätzung der MPN zunehmend an Bedeutung gewonnen und ist von einer umfassenden Diagnostik sowie Risikobewertung nicht mehr wegzudenken [69]. Auch die Histomorphologie hat nach wie vor einen hohen Stellenwert, der u.a. begründet ist in der Definition der Erkrankung [7,22], der klinisch relevanten Abgrenzung zur ET [46] und der Bestimmung des Fibrosegrades [19,48,87]. Ob die Histologie nun auch indirekte Hinweise auf das Vorliegen einer bestimmten Driver-Mutation und eventuellen weiteren somatischen

Non-Driver Mutation erbringen kann, was im Falle einer fehlenden Verfügbarkeit einer NGS-Untersuchung - beispielsweise in einkommensschwachen Ländern („low income countries“) - relevant wäre, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Das mediane Alter unserer Patient\*innenkohorte lag bei Diagnosestellung bei 55,07 Jahren (Range 23,3-74,89), was gut vergleichbar ist mit publizierten Daten in einem deutlich größeren präPMF-Kollektiv (Median 56,6 Jahre, Range 18.0-90.3) [40].

Die Inzidenz von Driver-Mutationen bei präPMF wird in der Fachliteratur für *JAK2* mit 59 - 67,2%, für *CALR* mit 18 - 26% und für *MPL* mit 3 - 4,7% angegeben. „Triple-negative“ Fälle machen 10,1-11% der präPMF-Fälle aus [40,71]. In unserer Kohorte waren *CALR*-Mutationen mit 48,3% (34,5% Typ 1 und 13,8% Typ 2) im Vergleich zu *JAK2* mit 51,7% annähernd gleich häufig repräsentiert, wobei zu berücksichtigen ist, dass in unserem Kollektiv Patient\*innen mit *MPL*- Mutationen oder ohne Driver-Mutation („triple negativ“) ausgeschlossen wurden, da keine molekularen Verlaufskontrollen möglich sind. Unter den *CALR*-mutierten war die *CALR* Typ1 Mutation gegenüber der *CALR* Typ2 Mutation bedeutend häufiger (Anteil am Gesamtkollektiv 34,5% vs.13,8%, siehe Tabelle 5 und Abbildung 17). Das häufigere Vorkommen der *CALR* Typ1 Mutation wird auch in einer großen italienischen Kohorte beschrieben, in der unter 278 präPMF Patient\*innen 12,2% eine *CALR* Typ1 und 5,8% eine *CALR* Typ2 Mutation aufwiesen [40].

Studien haben gezeigt, dass die abnorm proliferierte Megakaryopoese bei PMF nicht durch eine übermäßige Proliferation reifer Megakaryozyten, sondern durch eine abnorme Differenzierung früher multipotenter Stammzellen bedingt ist [88,89]. Auf zellulärer und molekularer Ebene konnte basierend auf Einzelzellanalyse das Gen-Expressionsprofil, das die Proliferation der Megakaryopoese vorantreibt, beschrieben werden. Die Überexpression von Megakaryozyten-assoziierten Genen ist signifikant höher in Zellen eines *JAK2* V617F- mutierten Klons als ohne diese Driver-Mutation. Eine Hemmung dieser abnormen Megakaryozytenproliferation über Klon- spezifische Targets könnte in Zukunft ein therapeutischer Ansatz sein [89].

Die Ausprägung der Hyperplasie der Megakaryopoese korrelierte in unserer Arbeit statistisch auffällig mit der Art der Driver-Mutation ( $p=0,003$ ); mit einer Ausnahme zeigten alle *JAK2*-mutierten Fälle (93,3%) eine mittelgradige Hyperplasie der Megakaryopoese, während *CALR* Typ2 Mutationen überwiegend (75%) und *CALR* Typ1 Mutationen in hohem Anteil (50%) mit einer hochgradigen Hyperplasie der

Megakaryopoese assoziiert waren. Dass bevorzugt die *CALR*- Mutation zu einer betonten Hyperplasie der Megakaryopoese führt, ist in Einklang mit dem klinischen Phänotyp einer betonten Thrombozytose. So ist die Assoziation von *CALR*-Mutationen mit höheren Thrombozytenwerten bei *BCR::ABL1*-negativen MPNs in der Fachliteratur gut beschrieben [64,90,91]. Dem zugrunde liegt die Aktivierung des Thrombopoetin-Rezeptors infolge der *CALR*-Mutation [23,92]. In einer Untersuchung zur ET zeigten *CALR* Typ2 im Vergleich zu *CALR* Typ1 mutierten Fälle eine etwas höhere mediane Thrombozytenzahl (1110 vs. 1001x10<sup>9</sup>/L) [90].

Megakaryozyten sind durch die Freisetzung profibrotischer Zytokine und Wachstumsfaktoren als eine der wichtigsten zellulären Triebkräfte in der Fibroseentstehung bekannt [88]. In unserer Kohorte war eine geringgradige Fibrose (Grad 1) bei Erstdiagnose häufiger bei Patient\*innen mit *CALR*-Mutation als bei Patient\*innen mit *JAK2*-Mutation (50% vs. 26,7%; p=0,196) zu finden. Drei der vier im Beobachtungszeitraum in eine PMF progredienten Fälle waren *CALR*-mutiert. Auch in einer chinesischen Studie wiesen *CALR*-mutierte MPN eine vermehrte Fibrose auf [93].

Die Megakaryopoese nimmt bei der histopathologischen Diagnosestellung einer MPN und insbesondere PMF einen hohen und insbesondere auch diagnostischen Stellenwert ein [7,22]. Eine rezente Übersichtarbeit widmet sich der Morphologie *BCR::ABL1*-negativer MPNs, in der detaillierter auf die Zellularität, die Verteilung der einzelnen Kompartimente der Hämatopoese, die Quantität und Lagerung der Megakaryozyten sowie die Fibrose eingegangen wird. Der Fokus ist jedoch auf die diagnostische Unterscheidung der Entitäten untereinander gerichtet, es wird kein Bezug auf die Driver- und Non-Driver Mutationen genommen. Dass die Megakaryopoese u.a. ein entscheidendes Merkmal in der Unterscheidung zwischen präPMF und ET ist, wird anhand der umfassenden Charakterisierung dieser Zellreihe (Lokalisation, dichte Cluster, Atypien, Größe, nackte Zellkerne, Kern/Zytoplasma-Ratio, Kernlobulierung, Kernchromatin) auch in dieser Studie deutlich [94].

Drei Arbeiten einer britischen Forschergruppe, die sich ebenfalls speziell mit der Morphologie der Megakaryopoese bei MPN beschäftigten, bedienten sich zur besseren Objektivierbarkeit der morphologischen Veränderungen der Anwendung von maschinellem Lernen und künstlicher Intelligenz [50,95,96]. So konnte ein automatisiertes Computer- Modell 9 verschiedene zytomorphologische Subtypen

unterscheiden, zusammen mit der topographischen Verteilung (Tendenz zur Clusterbildung, Dichte und Größe der Cluster) wurde dadurch eine bessere Zuordenbarkeit der MPN-Fälle (PV, ET, PMF inkl. sekundäre MF) und eine bessere Abgrenzung zu reaktiven Fällen möglich. Zudem konnte in dieser Studie eine statistisch signifikante Assoziation von zytomorphologischen Subtypen mit dem Driver-Mutationsstatus gefunden werden. Beispielsweise waren kleine Megakaryozytenkerne in der *CALR*-mutierten Gruppe signifikant unterrepräsentiert. PräPMF Patient\*innen waren in diesem Kollektiv jedoch nicht enthalten [95]. Unter Einbezug der Zellumgebung bzw. Gewebetopologie konnten mit Hilfe von komplexen neuronalen Graphnetzwerken die MPN-Subtypen untereinander rein auf Basis der Megakaryozytenpopulation identifiziert werden [96].

Nach umfassender Recherche sind nur zwei weitere Studien publiziert, die sich dem Zusammenhang zwischen histomorphologischen Charakteristika der Megakaryopoese in MPN und dem molekularen Profil – und hier bevorzugt bezogen auf den Driver-Mutationsstatus – widmeten [91,93]. Eine davon ist eine chinesische Untersuchung, die u.a. je 37 präPMF- und PMF-Patient\*innen enthielt. *CALR*-mutierte präPMF und PMF wiesen vermehrt dichte Cluster und sehr große Megakaryozytenformen auf. *CALR*-mutierte MPN generell zeigten sich u.a. charakterisiert durch vermehrte lockere und dichte Cluster sowie eine vermehrte Fibrose [93]. In der zweiten Studie wurden keine signifikanten Unterschiede in der Megakaryozytenmorphologie und der Retikulinfaserfibrose zwischen den unterschiedlichen, nach Driver-Mutationsstatus aufgeteilten Subgruppen, gefunden [91]. In unserer Arbeit waren dichte Megakaryozytencluster etwas häufiger bei *CALR*- als bei *JAK2*-Mutation zu finden. Generell haben wir den Fokus bei unserer Studie weniger auf die Zytomorphologie als auf die Lagerung der Megakaryozyten (Dichte der Cluster), die Ausprägung der Hyperplasie der Megakaryopoese sowie die Charakterisierung der Non-Driver Mutationen gelegt. Dies ist begründet durch die bekannte Interobserver-Variabilität, die insbesondere bei morphologischen Parametern wie beispielsweise Größe und Dysplasiezeichen der Megakaryozyten zu tragen kommt [97,98].

Dass das Alter bei Erstdiagnose einer MPN eine Rolle spielt, ist durch die gut in der Fachliteratur beschriebene, altersabhängige klonale Hämatopoese als Risikofaktor für die Entwicklung myeloischer Neoplasien bekannt. So sind somatische Mutationen bei



unter 40-Jährigen selten, während beispielsweise 70-79- Jährige in 9,5% und > 90-Jährige bereits in 18,4% klonale Mutationen aufweisen. Die häufigsten rekurrent mutierten Gene bei zunehmendem Alter finden sich in *DNMT3A*, *TET2*, and *ASXL1* [99]. In einer ganz rezent publizierten Studie zur molekularen Landschaft der MPN und insbesondere der fibrotischen PMF konnte gezeigt werden, dass zunehmendes Alter mit der gesteigerten Inzidenz von Non-Driver Mutationen korreliert und HMR-Gene häufiger und die VAF höher bei älteren Patient\*innen war [100]. Unsere Studie zeigte, dass das mediane Alter bei ED in der Kohorte mit Non-Driver Mutationen deutlich höher war ( $p=0,008$ ).

Keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den Kohorten ND und D ergaben sich in unserer Studie für das Auftreten einer geringgradigen Fibrose (MF 1) und einer hochgradigen Hyperzellularität im Knochenmark. Eine geringgradige Hyperzellularität war lediglich bei alleinigem Nachweis einer Driver-Mutation zu verzeichnen. Die morphologische Variable, die sich deutlich häufiger in der Kohorte mit Non-Driver Mutationen zeigte, waren dichte Megakaryozyten-Cluster. Für diese Beobachtungen betreffend die Histomorphologie bei präPMF in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (mit oder ohne zusätzliche Non-Driver Mutationen) sind nach ausführlicher Recherche bislang keine publizierten Daten vorhanden.

Die in unserer Studie nachgewiesenen Non-Driver Mutationen sind in der Fachliteratur gut beschrieben. Mutationen im *TET2*-Gen waren mit sechs Fällen in unserem Kollektiv die häufigsten (fünf davon bei *JAK2*-, eine bei *CALR* Typ1 Mutation), gefolgt von *DNMT3A*-Mutationen (zwei bei *CALR* Typ1 und eine bei *JAK2*-Mutation). Es gibt zahlreiche Publikationen, die den Einfluss der Non-Driver Mutationen auf die Prognose beschreiben [30,31,33,40,71,75,100–102]. Mutationen im *TET2*-Gen wurden 2009 in einer großen Studie bei verschiedensten myeloischen Neoplasien beschrieben. Die Häufigkeit bei MPN wurde mit etwa 12% (24/198 Patient\*innen) angegeben [103]. In einer rezenten Arbeit einer spanischen Forschergruppe wiesen 22% von gesamt 312 PMF-Patient\*innen eine *TET2*-Mutation auf, damit war die *TET2*-Mutation nach der *ASXL1*- Mutation (34%) die zweithäufigste Non-Driver Mutation bei fortgeschrittener PMF [104]. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kam eine koreanische Studie, die auch die präPMF-Gruppe separat untersuchte und hier die *TET2*-Mutation als häufigste Non-Driver Mutation (17,5%) gefolgt von *SF3B1*- und *DNMT3A*-Mutationen (je 10%) aufzeigen konnte. [105]. *TET2*-Mutationen können bereits in unreifen Progenitorzellen

vorkommen und dürften somit häufig ein frühes molekulares Ereignis darstellen und den *JAK2*-Mutationen im Krankheitsverlauf vorausgehen [103]. Bei Untersuchungen zu gemeinsamem Auftreten von Driver- und Non-Driver Mutationen waren bei Patient\*innen mit PMF Mutationen in den Genen *CALR* und *TET2* positiv korreliert ( $p < 0,001$ ), in der präPMF-Gruppe zeigte sich eine negative Korrelation zwischen *JAK2* und *TET2*-Mutationen ( $p = 0.038$ ) [105]. Im Gegensatz dazu beobachteten wir in unserer Studie bei 5 präPMF-Patient\*innen ein gemeinsames Auftreten von *TET2*- und *JAK2*-Mutationen. Die *TET2*-Mutation bei dem *CALR* Typ1 mutierten Fall in unserer Kohorte wurde in einem progredientem Stadium (PMF MF2) detektiert.

Heterozygote *DNMT3A*-Mutationen wurden in 3/46 (7%) Patient\*innen mit PMF beschrieben und sie traten koinzident mit *JAK2*, *ASXL1* und *TET2* auf [106]. Diese Mutationen sind in MPN nach *TET2* das zweithäufigste mutierte Gen und können zeitlich vor oder nach der *JAK2*-Mutation auftreten [107].

Eine HMR-Variante ist anhand der vorhandenen Fachliteratur bei präPMF in 27% zu erwarten,  $\geq 2$  HMR-Varianten sind mit 5,4 % als viel seltener beschrieben [40]. Der geringe Anteil von HMR-Varianten in unserer Kohorte bei nur 2 Patient\*innen (von insgesamt 13 mit Non-Driver Mutation = 15,4%) ist möglicherweise der kleinen Fallzahl und der Beschränkung auf Fälle mit *JAK2*- oder *CALR*-Mutation zu schulden. Eine der beiden Patient\*innen wies bei ED eine *EZH2*-Mutation vergesellschaftet mit einer *JAK2*-Mutation auf. Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass HMR-Mutationen mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben sowohl bei präPMF als auch bei fibrotischer PMF assoziiert sind [40]. *ASXL1*-Mutationen sind signifikant häufiger bei fortgeschrittener Myelofibrose zu finden (10,1% bei präPMF vs. 31,1% bei fibrotischer PMF vs. 51,1% bei PMF-AB/PB) da sie insbesondere die Fibrose voranzutreiben scheinen [71]. Die zweite Patientin mit einer HMR-Mutation in unserer Kohorte wies zwei unterschiedliche *ASXL1*-Mutationen auf (eine pathogene Variante mit einer VAF von 20,8% und eine wahrscheinlich pathogene Variante mit einer VAF 1,3%), die gemeinsam mit einer *CALR* Typ1 Mutation auftraten. Sie wurden 4 Jahre nach ED nachgewiesen, als sich bereits ein progredientes Stadium einer fibrotischen PMF mit MF 2 zeigte. Bei ED war in diesem Fall leider kein NGS verfügbar.

Eine rezente Studie untersuchte vergleichend das Mutationsprofil von fortgeschrittener MF und präPMF/ET/PV, auch im Hinblick auf die Prognose. In dieser auf RNA-Sequenzanalyse basierten Studie, die  $>1700$  Gene an 137 MPN-Patient\*innen

umfasste (der Großteil davon entfiel auf fibrotische PMF und nur ein kleiner Anteil auf ET/PV/präPMF), fanden sich >70% der Gene exklusiv in der fibrotischen PMF-Kohorte mutiert, darunter *EZH2*, *ZRSR2*- und *NF1*- Mutationen [100]. In unserem kleinen, selektiven Kollektiv von präPMF Patient\*innen fand sich je eine dieser drei erwähnten Mutationen bei je einer Patient\*in (*EZH2* und *NF1* mit niedriger VAF, *ZRSR2* mit hoher VAF). Das Knochenmark der Patient\*in mit *ZRSR2*-Mutation wurde auch im Verlauf noch mehrfach untersucht, im Verlauf entwickelte sich eine geringe Retikulinfaserfibrose (MF1). Die oben genannte Studie zeigte zudem, dass zahlreiche somatische Mutationen in den 12 häufigsten mutierten Genen (*JAK2*, *ASXL1*, *TET2*, *KRAS*, *SRSF2*, *NRAS*, *CBL*, *MPL*, *CALR*, *DNMT3A*, *U2AF1*, *EZH2*) vor allem mit fibrotischer PMF vergesellschaftet sind, wobei häufig Varianten in „low risk“-Genen (wie *CALR* und *DNMT3A*) gepaart auftraten. Dasselbe galt für „high risk“-Gene (*JAK2* und *ASXL1*) mit 26 *JAK2*- und *ASXL1*-komutierten Fällen (von insgesamt 72 *JAK2*-mutierten Fällen) [100]. Auch in unserer präPMF-Kohorte identifizierten wir komutierte „low risk“-Gene. So waren zwei Fälle mit *DNMT3A*- und *CALR*- Ko-Mutationen und 1 Fall mit *DNMT3A*- und *JAK2*-Komutation. Ko-mutierte „high risk“-Gene traten in unserer präPMF Kohorte nicht auf. Bei einem unserer *CALR* Typ1 mutierten Fälle kam es im weiteren Verlauf zum Fortschreiten der Fibrose (MF2) begleitet mit dem zusätzlichen Auftreten einer *ASXL1*-Mutation wie oben beschrieben. Eine französische Forschungsgruppe zeigte, dass *ASXL1*-Mutationen bei fortgeschrittener MF nur dann mit ungünstiger Prognose vergesellschaftet sind, wenn sie in Kombination mit *TP53*- oder anderen HMR-Varianten auftreten. [108]. In einer rezenten Studie erwies sich außerdem die Höhe der VAF der *ASXL1*-Mutation als prognostisch relevant. Während bei einem Cut-off von unter 1% kein Überlebensnachteil vorlag, konnte bei einer VAF >5% ein solcher nachgewiesen werden, statistische Signifikanz zeigte sich jedoch erst bei einer VAF von >20% [104].

*CBL*-Mutationen sind auf niedrigem, aber signifikanten Niveau in MPN beschrieben [30]. Mutationen im *CBL*-Gen waren u.a. in einer multivariaten Analyse einer schwedischen Kohorte assoziiert mit einem kürzeren Gesamtüberleben. Wie auch in unserem Fall (*DNMT3A*- und *CBL*- Ko-Mutation) waren in der schwedischen Studie Mutationen im *CBL*-Gen mit einer anderen Non-Driver Mutation vergesellschaftet, wobei es sich durchwegs um Kombinationen mit HMR-Varianten handelte [109]. Eine 464 MF-Patient\*innen umfassende Studie kam zum Schluss, dass *RAS/CBL*-

Mutationen eine Therapieresistenz bzw. ein schlechteres Ansprechen auf *JAK2*-Inhibitoren vorhersagen könnten [110].

Dass auch die zeitliche Reihenfolge, in der die Mutationen auftreten, den klinischen Phänotyp der Erkrankung mitbestimmen, wurde mehrfach beschrieben [26,107,111,112]. Die Driver-Mutationen *CALR* und *MPL* treten eher früher in der Krankheitsentstehung auf, während beispielsweise Mutationen in den Genen *NRAS* und *TP53* signifikant häufiger im späteren Krankheitsverlauf hinzukommen. Die ebenfalls zumeist früher auftretenden *SF3B1*- und *DNMT3A*-Mutationen sind auch mit altersabhängiger klonaler Hämatoopoese von unbestimmtem Potential (CHIP) vergesellschaftet, was darauf hinweist, dass sich MPN aus einem vorbestehenden, asymptomatischen Klon entwickeln [30]. In Studien zur klonalen Evolution konnte anhand hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen gezeigt werden, dass Mutationen in *DNMT3A* oder *TET2*, die vor *JAK2* V617F auftraten, eher mit einer ET assoziiert sind, während *JAK2* V617F als erste Mutation vor *DNMT3A* oder *TET2* eher mit einer PV assoziiert ist. Anders formuliert trat *JAK2* V617F bei ET häufiger als sekundäre Mutation auf, im Unterschied zu PV und PMF, wo sie häufiger als Erstmutation gefunden wurde. Patient\*innen, die zuerst eine *JAK2*-Mutation und erst nachfolgend eine *TET2*-Mutation erworben haben, waren signifikant jünger als jene mit primärer *TET2*-Mutation, hatten häufiger ein thromboembolisches Ereignis und zeigten sich *in vitro* sensitiver auf *JAK2*-Inhibitor-Therapie [107,112]. In einer profunden, auf „whole-genome-sequencing“ (WGS)-basierten Untersuchung wurden phylogenetische Bäume erstellt und die zeitliche und dynamische Entwicklung von Klonen anhand von 12 MPN-Patient\*innen abgeleitet. So wurde berechnet, dass *JAK2*-Mutationen, sofern sie das erste Ereignis darstellten, manchmal bereits in Utero bzw. in den ersten Lebensjahren entstehen. Weitere genomische Ereignisse traten als unabhängige klonale Expansionen vor oder nach dem Erwerb von *JAK2* V617F auf. Mutationen traten sequenziell über das ganze Leben auf und deren Erwerb war zeitlich durch Jahrzehnte voneinander getrennt und verdrängte bereits bestehende Klone. Zwischen dem Auftreten der *JAK2*-Mutation und der Diagnosestellung lag ein durchschnittlicher Zeitraum von 30 Jahren [111].

Bezüglich der in unserer Kohorte beschriebenen *NOTCH1*-Variante mit einer VAF von 49,8% bleibt bei fehlender gleichzeitiger Analyse von peripherem Blut (PB) offen, ob diese eine Keimbahnvariante mit genetischer Prädisposition darstellt. Bei der Variante

handelt es sich um eine Substitution von Cytosin durch Guanin an der Position 6181-24 (c.6181-24C>G), die sich im nicht kodierenden Bereich (Intron) in einer „Splice-site“-Region findet, was zu falschem Spleißen und folglich starken Veränderung in der Proteinstruktur und -funktion führen kann. In den uns zur Verfügung stehenden Datenbanken war diese kaum beschrieben und wurde daher als Variante mit unbekannter Bedeutung klassifiziert. In einer schwedischen MPN-Kohorte kamen Varianten in *CDKN2A*, *ETV6*, *NOTCH1* und *MPL* mit einer VAF von um 50% vor, von denen sich nur jene im *ETV6* Gen als häufiger in der MPN-Kohorte als in der Gesamtpopulation herausstellte [109]. Eine familiäre Häufung von MPN ist jedenfalls aus der Fachliteratur bekannt. So wurden in einer 2007 publizierten Studie bei 8,2% der PMF- Patient\*innen mehrere Fälle innerhalb von Familien identifiziert. Interessanterweise haben sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede in klinischen und hämatologischen Merkmalen zwischen sporadischen und familiären Fällen gezeigt [113]. Die Driver-Mutationen in *JAK2*, *CALR* und *MPL* W515L sind nicht vererbt, vielmehr ist das gehäufte familiäre Risiko auf das Vorhandensein prädisponierender genetischer Suszeptibilitätsfaktoren zurückzuführen [29]. Untersuchungen haben gezeigt, dass *JAK2* V617F-positive Erkrankungen (sowohl MPN als auch CHIP) stark mit einem spezifischen konstitutionellen *JAK2*-Haplotyp (sog. 46/1 Haplotyp) assoziiert sind. Patient\*innen mit dem *JAK2* 46/1 Haplotyp haben somit ein höheres Risiko, eine *JAK2* V617F-Mutation zu erwerben [114,115]. So tritt auch eine homozygote *JAK2* V617F-Mutation nicht zufällig, sondern bevorzugt auf, wenn ein bestimmter *JAK2*-Haplotyp vorhanden ist [115].

## 6.1. Limitationen

Eine wesentliche Limitation der vorliegenden Studie stellt die beschränkte Anzahl eingeschlossener Fälle dar, was auf den bislang eingeschränkten Einsatz von NGS-Untersuchung bei Erstdiagnose sowie im Verlauf der PMF zurückzuführen ist. Die Aussagekraft zur klonalen Evolution ist bei lückenhafter NGS-Untersuchung im Verlauf beschränkt.

Häufig waren auch keine sequenziellen Knochenmarkbiopsien vorhanden, sodass die Beurteilung einer etwaigen Progression der Erkrankung nicht bei allen Patient\*innen möglich war.

Weiters ist die Inter- und Intraobserver-Variabilität bei der Beurteilung der Morphologie, insbesondere in der Quantifizierung des Ausmaßes der Hyperzellularität oder der Dichte der Cluster zu erwähnen.

Die Inkludierung von den 5 Patient\*innen in die Kohorte mit alleiniger Driver-Mutation, die erst unter Interferon-Therapie im Krankheitsverlauf NGS getestet wurden und dabei negativ für eine zusätzliche Non-Driver waren, ist als weitere Limitation zu erwähnen.

## 7. Konklusion

Erkenntnisse aus Studien zur molekulargenetischen Charakterisierung unterstreichen die Wichtigkeit der Abgrenzung der präPMF von der fortgeschrittenen Myelofibrose und ergänzen die etablierten, guten histomorphologischen und klinischen Diagnosestandards. Molekulargenetische Erkenntnisse werden sicherlich auch bei präPMF in künftige eigene Prognosescores einfließen.

Diese Studie stellt eine der wenigen in der Fachliteratur beschriebenen Untersuchungen an einer präPMF-Kohorte dar, die histomorphologische Parameter mit dem Mutationsprofil in Zusammenhang setzt. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass das Vorhandensein von *CALR*-Mutationen deutlich häufiger mit einer hochgradigen Megakaryozytenhyperplasie assoziiert ist und Patient\*innen mit *CALR*-Mutation etwas häufiger bei Diagnose bereits eine geringgradige Fibrose aufweisen. Das zusätzliche Vorhandensein von Non-Driver Mutationen korreliert deutlich mit dichteren Megakaryozytenclustern. Non-Driver Mutationen waren außerdem etwas häufiger mit einer bereits geringgradigen Fibrose bei Diagnose sowie einer hochgradigen Hyperzellularität assoziiert, wobei hier kein statistisch bedeutsamer Unterschied gezeigt werden konnte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Mutationsstatus teilweise mit speziellen histomorphologischen Charakteristika assoziiert sein könnte. Für eine Bestätigung dieser Beobachtungen sind Analysen an größeren Kohorten erforderlich. Da bei seltenen Erkrankungen retrospektive Studien einen großen Stellenwert haben, wäre eine breitere Anwendung molekulargenetischer Analysen bei Patient\*innen mit MPN wünschenswert.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14–22. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404955>.
- [2] Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372–5.
- [3] Thiele J, Georgii A, Vykoupil K. Ultrastructure of chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis. *Blut* 1976;32:433–8.
- [4] Thiele J, Simon KG, Fischer R, Zankovich R. Follow-up Studies with Sequential Bone Marrow Biopsies in Chronic Myeloid Leukaemia and So-called Primary (Idiopathic) Osteo-myelofibrosis: Evolution of Histopathological Lesions and Clinical Course in 40 Patients. *Pathol Res Pract* 1988;183:434–45. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(88\)80090-6](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(88)80090-6).
- [5] Vardiman J, Brunning R, Harris N. WHO histological classification of chronic myeloproliferative diseases. In: Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J, editors. *World Health Organization Classification of Tumors: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France: 2001, p. 17–44.
- [6] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14–22. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404955>.
- [7] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391–405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- [8] Jacobson RJ, Solo A, Fialkow PJ. Agnogenic Myeloid Metaplasia: A Clonal Proliferation of Hematopoietic Stem Cells With Secondary Myelofibrosis. *Blood* 1978;51:189–94.
- [9] Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF)-a clinicopathological study. vol. 13. 1999.
- [10] Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann Hematol* 2001;80:160–5. <https://doi.org/10.1007/s002770000278>.
- [11] Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28:1472–7. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.3>.
- [12] Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Szuber N, Finke CM, Lasho TL, et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am J Hematol* 2018;93:348–55. <https://doi.org/10.1002/ajh.24978>.
- [13] Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol* 2016;91:50–8. <https://doi.org/10.1002/ajh.24221>.
- [14] Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood* 2017;130:2475–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06>.
- [15] Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation



- in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014;123. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554634>.
- [16] Paz DL, Kralovics R, Skoda RC. Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood Review Series* 2023;141:1909–21.
- [17] Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Gianelli U, Gangat N, Vannucchi AM, et al. The international consensus classification of myeloid neoplasms and acute Leukemias: myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2023;98:166–79. <https://doi.org/10.1002/ajh.26751>.
- [18] Pozdnyakova O, Rodig S, Bhandarkar S, Wu K, Thiele J, Hasserjian R. The importance of central pathology review in international trials: A comparison of local versus central bone marrow reticulin grading. *Leukemia* 2015;29:241–4. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.262>.
- [19] Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, Van Der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 2005;90:1128–32.
- [20] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.
- [21] Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* 2018;8:15. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>.
- [22] Kanagal-Shamanna R, Naresh KN, Dave SS. et al. Primary Myelofibrosis. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours* [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2024 [cited 2024 april 28<sup>th</sup>]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>.
- [23] Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017;129:667–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10>.
- [24] Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 1976;295:913–6. <https://doi.org/10.1056/NEJM197610212951702>.
- [25] Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X-Chromosome activity: Studies using the gene for G-&PD-Deficiency as a marker\*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1961:9–16.
- [26] Calabresi L, Carretta C, Romagnoli S, Rotunno G, Parenti S, Bertesi M, et al. Clonal dynamics and copy number variants by single-cell analysis in leukemic evolution of myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 2023;98:1520–31. <https://doi.org/10.1002/ajh.27013>.
- [27] Miles LA, Bowman RL, Merlinsky TR, Csete IS, Ooi AT, Durruthy-Durruthy R, et al. Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature* 2020;587:477–82. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2864-x>.
- [28] Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014;123. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554634>.

- [29] Greenfield G, McMullin MF, Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol* 2021;14. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01116-z>.
- [30] Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* 2018;379:1416–30. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1716614>.
- [31] Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: Genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia* 2018;32:1631–42. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0107-z>.
- [32] Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:1861–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.119>.
- [33] Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28:1804–10. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.76>.
- [34] Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Podoltsev NA, Zeidan AM. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Rev* 2020;42. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100706>.
- [35] Coltro G, Loscocco GG, Vannucchi AM. Classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs): A continuum of different disease entities. *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 365, Elsevier Inc.; 2021, p. 1–69. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.09.001>.
- [36] Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf ÅR, Kristinsson SY, et al. Risk for arterial and venous thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms: A population-based cohort study. *Ann Intern Med* 2018;168:317–25. <https://doi.org/10.7326/M17-0028>.
- [37] Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* 2008;112:3065–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143537>.
- [38] Verstovsek S, Vannucchi AM, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. *Haematologica* 2016;101:821–9. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.143644>.
- [39] Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P, et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* 2018;8:15. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y>.
- [40] Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis 2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01>.
- [41] Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: A international study. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:3179–84. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.5298>.

- [42] Tzankov A, Dirnhofer S, Beham-Schmid C. Normales Knochenmark und häufige reaktive Veränderungen. *Pathologe* 2012;33:496–507. <https://doi.org/10.1007/s00292-012-1649-x>.
- [43] Wong J, Jackson R, Chen L, Song J, Pillai R, Afkhami M, et al. Determination of age-dependent bone marrow normocellularity. *Am J Clin Pathol* 2023. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqad129>.
- [44] Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF)-a clinicopathological study. vol. 13. 1999.
- [45] Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V. Standardization of bone marrow features--does it work in hematopathology for histological discrimination of different disease patterns? *Histol Histopathol* 2005;20:633–44. <https://doi.org/10.14670/HH-20.633>.
- [46] Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: A multicenter study to validate the WHO classification. *Blood* 2011;117:5710–8. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-293761>.
- [47] Madelung AB, Bondo H, Stamp I, Loevgreen P, Nielsen SL, Falensteen A, et al. World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: Morphological reproducibility and clinical correlations-The Danish experience. *Am J Hematol* 2013;88:1012–6. <https://doi.org/10.1002/ajh.23554>.
- [48] Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings - A clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol* 2006;85:226–32. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-0042-8>.
- [49] Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Modern Pathology* 2012;25:1193–202. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.87>.
- [50] Ryou H, Sirinukunwattana K, Aberdeen A, Grindstaff G, Stolz BJ, Byrne H, et al. Continuous Indexing of Fibrosis (CIF): improving the assessment and classification of MPN patients. *Leukemia* 2023;37:348–58. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01773-0>.
- [51] Gleitz HFE, Benabid A, Schneider RK. Still a burning question: The interplay between inflammation and fibrosis in myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 2021;28:364–71. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000669>.
- [52] Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* 2020;20:285–98. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>.
- [53] Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30:229–36. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(01\)00789-5](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00789-5).
- [54] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 2005;352.
- [55] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005;365:1054–61. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)71142-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)71142-9).

- [56] James C, Rie Ugo V, Le Coué Dic J-P, Staerk J, Ois Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- [57] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.023>.
- [58] Latagliata R, Polverelli N, Tieghi A, Palumbo GA, Breccia M, Sabattini E, et al. Comparison of JAK2V617F-positive essential thrombocythaemia and early primary myelofibrosis: The impact of mutation burden and histology. *Hematol Oncol* 2018;36:269–75. <https://doi.org/10.1002/hon.2430>.
- [59] Scott LM, Tong W, Levine RL. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *Abstracts of the American Society of Hematology*. vol. 356. 2007.
- [60] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med* 2006;12:1140–51. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0060114>.
- [61] Pardananani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-018879>.
- [62] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009;417:651–66. <https://doi.org/10.1042/BJ20081847>.
- [63] Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine* 2013;369:2391–405. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1312542>.
- [64] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* 2013;369:2379–90. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1311347>.
- [65] Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124:1062–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-578435>.
- [66] Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood* 2014;124:2465–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588426>.
- [67] Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv* 2016;1:105–11. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000208>.
- [68] Mascarenhas J, Gleitz HFE, Chifotides HT, Harrison CN, Verstovsek S, Vannucchi AM, et al. Biological drivers of clinical phenotype in myelofibrosis. *Leukemia* 2023;37:255–64. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01767-y>.
- [69] Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2017;36:310–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.36.310>.
- [70] Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, Artusi V, Artuso L, Bernardis I, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the

- COMFORT-II study. *Blood* 2014;123:2157–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-536557>.
- [71] Yan X, Xu Z, Zhang P, Sun Q, Jia Y, Qin T, et al. Non-driver mutations landscape in different stages of primary myelofibrosis determined ASXL1 mutations play a critical role in disease progression. *Blood Cancer J* 2023;13. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00829-3>.
- [72] Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International working group for myelofibrosis research and treatment. *Blood* 2009;113:2895–901. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170449>.
- [73] Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011;29:392–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.2446>.
- [74] Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia* 2018;32:2274–8. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0078-0>.
- [75] Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2018;36:1769–70. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.9867>.
- [76] Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Wassie EA, Knudson R, Ketterling RP, et al. U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia* 2014;28:431–3. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.286>.
- [77] Mosquera-Orgueira A, Pérez-Encinas M, Hernández-Sánchez A, González-Martínez T, Arellano-Rodrigo E, Martínez-Elicegui J, et al. Machine Learning Improves Risk Stratification in Myelofibrosis: An Analysis of the Spanish Registry of Myelofibrosis. *Hemasphere* 2023;7:e818. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000818>.
- [78] Finazzi G, Vannucchi AM, Barbui T. Prefibrotic myelofibrosis: treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J* 2018;8. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0142-z>.
- [79] Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* 2018;32:1057–69. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0077-1>.
- [80] Silver RT, Barel AC, Lascu E, Ritchie EK, Roboz GJ, Christos PJ, et al. The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- $\alpha$  (rIFN $\alpha$ ) treatment in early myelofibrosis. *Cancer* 2017;123:2680–7. <https://doi.org/10.1002/cncr.30679>.
- [81] Griebhammer, M., Baerlocher, G.M., Döhner, K. et al. Primäre Myelofibrose (PMF). In: *Onkopedia Leitlinien* [Internet]. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.; 2024 [cited 2024, april 28<sup>th</sup>]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/primaere-myelofibrose-pmf/@@guideline/html/index.html>
- [82] Harrison C, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:787–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110556>.

- [83] Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366:799–807. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110557>.
- [84] Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia* 2015;29:2126–33. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.233>.
- [85] Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, Sun W, Cortes J, Kantarjian HM, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Hematol Oncol* 2018;11:42. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0585-5>.
- [86] Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2023;98:801–21. <https://doi.org/10.1002/ajh.26857>.
- [87] Pozdnyakova O, Rodig S, Bhandarkar S, Wu K, Thiele J, Hasserjian R. The importance of central pathology review in international trials: A comparison of local versus central bone marrow reticulin grading. *Leukemia* 2015;29:241–4. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.262>.
- [88] Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;110:986–93. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064626>.
- [89] Psaila B, Wang G, Rodriguez-Meira A, Li R, Heuston EF, Murphy L, et al. Single-Cell Analyses Reveal Megakaryocyte-Biased Hematopoiesis in Myelofibrosis and Identify Mutant Clone-Specific Targets. *Mol Cell* 2020;78:477–492.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.008>.
- [90] Elala YC, Lasho TL, Gangat N, Finke C, Barraco D, Haider M, et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2016;91:503–6. <https://doi.org/10.1002/ajh.24338>.
- [91] Wong WJ, Hasserjian RP, Pinkus GS, Breyfogle LJ, Mullally A, Pozdnyakova O. JAK2, CALR, MPL and ASXL1 mutational status correlates with distinct histological features in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2018;103:e63–8. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178988>.
- [92] Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu R-I, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants 2016. <https://doi.org/10.1182/blood>.
- [93] Shi ZX, Zhang PH, Li B, Fang LH, Xu ZF, Qin TJ, et al. [Pathological characteristics of megakaryocytes in myeloproliferative neoplasms and their correlation with driver gene mutations]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2020;41:798–805. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.002>.
- [94] Ng ZY, Fuller KA, Mazza-Parton A, Erber WN. Morphology of myeloproliferative neoplasms. *Int J Lab Hematol* 2023;45:59–70. <https://doi.org/10.1111/ijlh.14086>.
- [95] Sirinukunwattana K, Aberdeen A, Theissen H, Sousos N, Psaila B, Mead AJ, et al. Artificial intelligence-based morphological fingerprinting of megakaryocytes: a new tool for assessing disease in MPN patients. *Blood Adv* 2020;4:3284–94. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002230>.
- [96] Theissen H, Chakraborty T, Malacrino S, Royston D, Rittscher J. Multi-Scale Graphical Representation of Cell Environment. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2022;2022:3522–5. <https://doi.org/10.1109/EMBC48229.2022.9871710>.

- [97] Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, Sabattini E, Tripodo C, Boveri E, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Mod Pathol* 2014;27:814–22. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.196>.
- [98] Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, Buck G, Wheatley K, East CL, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood* 2008;111:60–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-091850>.
- [99] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman P V., Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine* 2014;371:2488–98. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1408617>.
- [100] Kandarpa M, Robinson D, Wu Y-M, Qin T, Pettit K, Li Q, et al. Broad next generation integrated sequencing of myelofibrosis identifies disease-specific and age-related genomic alterations. *Clin Cancer Res* 2024. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-0372>.
- [101] Li B, Gale RP, Xu Z, Qin T, Song Z, Zhang P, et al. Non-driver mutations in myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. *J Hematol Oncol* 2017;10. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0472-5>.
- [102] Tefferi A, Vannucchi AM. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms. *Mayo Clin Proc* 2017;92:1283–90. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.06.002>.
- [103] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N Engl J Med* 2009;360:2289–301.
- [104] Hernández-Sánchez A, Villaverde-Ramiro Á, Arellano-Rodrigo E, Garrote M, Martín I, Mosquera-Orgueira A, et al. The prognostic impact of non-driver gene mutations and variant allele frequency in primary myelofibrosis. *Am J Hematol* 2024;99:755–8. <https://doi.org/10.1002/ajh.27203>.
- [105] Kim TY, Kwag D, Lee JH, Lee J, Min GJ, Park SS, et al. Clinical Features, Gene Alterations, and Outcomes in Prefibrotic and Overt Primary and Secondary Myelofibrotic Patients. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/cancers14184485>.
- [106] Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011;25:1219–20. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.82>.
- [107] Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, Godfrey AL, Grinfeld J, Thakker C, et al. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica* 2015;100:e438-42. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.129510>.
- [108] Luque Paz D, Riou J, Verger E, Cassinat B, Chauveau A, Ianotto J-C, et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: a FIM study. *Blood Adv* 2021;5:1442–51. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003444>.
- [109] Pettersson H, Adamsson J, Johansson P, Nilsson S, Palmqvist L, Andréasson B, et al. The clinical relevance of broad mutational screening of myeloproliferative neoplasms at diagnosis. *Front Oncol* 2023;13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1190305>.
- [110] Coltro G, Rotunno G, Mannelli L, Mannarelli C, Fiaccabrino S, Romagnoli S, et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are



associated with poor prognostic features. *Blood Adv* 2020;4:3677–87. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002175>.

- [111] Williams N, Lee J, Mitchell E, Moore L, Baxter EJ, Hewinson J, et al. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. *Nature* 2022;602:162–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04312-6>.
- [112] Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* 2015;372:601–12. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1412098>.
- [113] Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007;25:5630–5. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.6896>.
- [114] Bick AG, Weinstock JS, Nandakumar SK, Fulco CP, Bao EL, Zekavat SM, et al. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature* 2020;586:763–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2819-2>.
- [115] Jones A V, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 2009;41:446–9. <https://doi.org/10.1038/ng.334>.

## 9. Tabellen

Tabelle 1: Somatische Mutationen in MPN

Tabelle 2: WHO-Kriterien der präPMF

Tabelle 3: Vorschlag für Definition der Zellularität und Altersgruppen

Tabelle 4: Semiquantitative Graduierung der Myelofibrose

Tabelle 5: Patient\*innencharakteristika bei Erstdiagnose

Tabelle 6: Charakterisierung der somatischen Non-Driver Mutationen im Gesamtkollektiv

Tabelle 7: Kohortenvergleich der histomorphologischen Parameter

Tabelle 8: Somatische Non-Driver Mutationen in Bezug auf die jeweilige Driver-Mutation

Tabelle 9.1.: Krankheitscharakteristika in Abhängigkeit von der Art der Driver-Mutation (*CALR* vs. *JAK2*)

Tabelle 9.2.: Krankheitscharakteristika in Abhängigkeit von der Driver-Mutation unter zusätzlicher Unterscheidung *CALR* Typ1 und *CALR* Typ2 Mutationen

## 10. Abbildungen

Abbildung 1: Aktivierte Signalkaskaden in MPN

Abbildung 2: Klinische Präsentation in Abhängigkeit von „phenotypic driver“ Mutationen

Abbildung 3: Bedeutung von Mutationen in MPN bzw. PMF für die Gesamtüberlebensrate

Abbildung 4: Vergleich der kumulativen Inzidenz der Mortalität zwischen ET, präPMF, fortgeschrittener PMF und PV jeweils 5, 10 und 15 Jahre ab Diagnose

Abbildung 5: Altersabhängige Zellularität des Knochenmarks

Abbildung 6: Charakteristische Morphologie der Megakaryopoese bei präPMF

Abbildung 7: Diagnostische Kriterien zur Unterscheidung zwischen ET und präPMF, einschließlich standardisierter morphologischer Merkmale

Abbildung 8: Darstellung der Myelofibrose (MF) mittels Versilberung nach Gomori

Abbildung 9: Variabilität der Retikulinfaserfibrose innerhalb von KM-Biopsien

Abbildung 10: Mutationen in *JAK2*, *CALR*, *MPL* führen zu exzessiver Myeloproliferation über konstitutive Aktivierung *JAK2* nachgeschalteter Signalwege

Abbildung 11: Wildtyp Sequenz und G→T Mutation im *JAK2*-Gen

Abbildung 12: DNA-Sequenz und Protein-Translation für Wildtyp und mutierte *MPL*-Allele

Abbildung 13: Ergebnisse der PCR und Sanger- Sequenzierung der beiden häufigsten *CALR*-Varianten

Abbildung 14: Häufigkeit der *CALR*- Mutationen in PV, ET und PMF

Abbildung 15: Assoziation zwischen Non-Driver Mutationen und Stadium der PMF. Vergleich der Mutationsfrequenz zwischen präPMF und fortgeschrittener PMF

Abbildung 16: Risikoangepasster Behandlungsansatz bei PMF unter Verwendung des MIPSS v2.

Abbildung 17: Anteil der unterschiedlichen Driver-Mutationen im Gesamtkollektiv

## 11. Abkürzungsverzeichnis

AKT	AKT Serin-Threonin-Kinase
AlloSZT	Allogene Stammzelltransplantation
AUC	Area Under the Curve
bp	Basenpaar
BM	Bone Marrow
CALR	Calretikulin
CEL	Chronische Eosinophilenleukämie
CHIP	Klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNL	Chronische Neutrophilenleukämie
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
ED	Erstdiagnose
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor
ERK	Extracellular Signal-Related Kinase
ET	Essentielle Thrombozythämie
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
GCSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GIPSS	Genetically Inspired International Prognostic Scoring System
G-6-PD	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
Hb	Hämoglobin
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HMR	Hohes molekulares Risiko
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ID	Identifikationsnummer
IPSS	International Prognostic Scoring System
JAK2	Janus Kinase 2
KI	Künstliche Intelligenz
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase

LOH	loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MEK	Mitogen-activated protein Kinase Kinase
MIPSS	Mutation-enhanced International Prognostic Scoring System
MF	Myelofibrose bzw. Myelofibrosis
<i>MPL</i>	Myeloproliferative Leukemia Virus Onkogen, kodiert für den Thrombopoietin-Rezeptor
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MPN-U	Myeloproliferative Neoplasie, unklassifizierbar
NACE	Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung
NGS	Next Generation Sequencing
NOS	Not Otherwise Specified, nicht weiter spezifiziert
o.g.	oben genannt
OR	Odds Ratio
PB	Peripheres Blut
Peg INF $\alpha$	Pegyliertes Interferon alpha
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
PräPMF	Präfibrotische Primäre Myelofibrose
PMF	Primäre Myelofibrose
PMF-AP/BP	Akzelerierte Phase/Blastenphase der PMF
PV	Polycythämia Vera
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
qPCR	Quantitative PCR
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Ras sarcoma virus
VAF	Variante Allelfrequenz
WES	Whole Exome Sequencing
WHO	World Health Organisation