



## BCR-ABL1-negative myeloproliferative Neoplasien (MPN)

### Diagnostische Empfehlung

Methode	Antikoagulans	Empfehlung
Zytomorphologie	EDTA	obligat
Immunphänotypisierung	EDTA oder Heparin	fakultativ
Chromosomenanalyse	Heparin	obligat
FISH	EDTA oder Heparin	fakultativ
Molekulargenetik	EDTA oder Heparin	obligat



Myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind seltene, irreversible klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle. Die jährliche Inzidenz liegt bei etwa 1-2/100.000. MPN betreffen in der Regel Menschen des höheren Lebensalters mit einem Median von 60-65 Jahren. Charakteristisch ist eine Hyperzellularität des Knochenmarks speziell der myeloischen Zellreihe und je nach Entität eine erhöhte Anzahl von Erythrozyten, Granulozyten und/oder Thrombozyten im peripheren Blut.

### Klassifikation

Die BCR-ABL1-negativen chronischen myeloproliferativen Neoplasien (MPN) werden unterteilt in Polycythämia vera (PV), primäre Myelofibrose (PMF) (früher auch Osteomyelofibrose (OMF) oder chronische idiopathische Myelofibrose (CIMF)), essentielle Thrombozythämie (ET) und unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MPN-U). Darüber hinaus werden die Chronische Neutrophilenleukämie (CNL), die Chronische Eosinophilenleukämie (CEL) ohne spezifische Rearrangements dazugezählt.

Im Gegensatz zur CML, die durch das Vorliegen eines BCR-ABL1-Rearrangements bzw. eines Philadelphia Chromosoms eindeutig definiert ist, handelt es sich bei den BCR-ABL1-negativen myeloproliferativen Erkrankungen aus zytogenetischer und molekulargenetischer Sicht um eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen. Dies gilt in Bezug auf die Häufigkeit und Art klonaler Chromosomenaberrationen sowie molekulargenetischer Veränderungen. Tabelle 1 zeigt die Klassifikation der MPN gemäß WHO 2017.

**Tabelle 1: MPN WHO-Klassifikation 2017**  
(Swerdlow et al., 2017)

<b>Myeloproliferative Neoplasien (MPN)</b>	
Chronische myeloische Leukämie (CML)	BCR-ABL1-positiv
Chronische Neutrophilen-Leukämie (CNL)	BCR-ABL1-negativ
Polyzythämia vera (PV)	
Primäre Myelofibrose (PMF) • Präfibrotisches Stadium • Fibrotisches Stadium	
Essentielle Thrombozythämie (ET)	
Chronische Eosinophilen-Leukämie, nicht anderweitig klassifiziert (NOS)	
MPN, nicht klassifizierbar (MPN-U)	

### Diagnostik

#### Zytomorphologie

Die zytomorphologische Beurteilung bei den MPN bezieht die Zellularität im Gesamten sowie in den einzelnen hämatopoetischen Reihen ein. Wichtig ist auch die Feststellung des Blastenanteils im Blut und Knochenmark. Für spezielle Fragen (bei Verdacht auf eine refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose; MDS/MPN-RS-T) ist darüber hinaus die Eisenfärbung relevant. Besteht eine Fibrosierung des Knochenmarks z.B. bei primärer Myelofibrose (PMF), ist oftmals die zytomorphologische Beurteilbarkeit der Präparate eingeschränkt (punctio sicca).

Maßgeblich für die Beurteilung des Fasergrads und der Knochenmarkarchitektur ist in allen Fällen die Histologie, welche bei vermuteter oder gesicherter MPN immer durchgeführt werden sollte.

#### Chromosomenanalyse

Die klassische Chromosomenanalyse dient zur Bestimmung des Karyotyps. Die bei MPN auftretenden Karyotyp-Veränderungen sind vielfältig. Meist finden sich unbalancierte Karyotyp-Veränderungen wie die Trisomie 8 oder Trisomie 9, Trisomie 9p, Deletionen im langen Arm eines Chromosoms 20 oder 13 sowie der Zugewinn von Material des langen Armes von Chromosom 1 (Swerdlow et al., 2017).

#### Unbalancierte Translokationen sind charakteristisch bei MPN

Chromosomale Aberrationen werden am häufigsten bei der PMF beobachtet (+0%), gefolgt von PV (35%), wohingegen sich Karyotypveränderungen bei der ET nur selten finden lassen (~ 3%) (Bacher et al. 2005). Über 80% der chromosomalen Aberrationen bei MPN sind unbalancierte Veränderungen, wobei die Trisomie 8 (+8) die häufigste klonale Veränderung darstellt (~ 20% der PV-Fälle, 10% der PMF-Fälle). Das Vorliegen einer Trisomie 8 lässt allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf die Art der Erkrankung zu, da sie auch bei MDS und AML auftritt. Spezifischer ist bei der PV der Nachweis einer Trisomie 9 oder Trisomie 9p, die in etwa 10% der Fälle beobachtet werden. Diese gehen praktisch immer mit einer homozygoten V617F Mutation im JAK2-Gen einher. Weitere Veränderungen bei MPN betreffen Chromosom 7 (-7, 7q-), die oftmals in Kombination mit JAK2-Mutationen vorkommen (Dunlap et al. 2011). Eine typische Veränderung stellt auch die Deletion im langen Arm eines Chromosoms 20 (del(20q)) dar. Zugewinne von Material des langen Armes von Chromosom 1 (+1q) und Deletionen im langen Arm von Chromosom 13 (del(13q)) finden sich gehäuft bei der PMF (6 bzw. 10% der Fälle). Bei PV und PMF werden außerdem Deletionen im kurzen Arm des Chromosoms 12 (del(12p)) beobachtet. Weitere zytogenetische Veränderungen bei MPN sind der Verlust des Y-Chromosoms (-Y) sowie ein Zugewinn eines Chromosoms 19 (+19) (Bacher et al., 2005; Swerdlow et al., 2017).

#### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Im Rahmen der Diagnostik der MPN ist die FISH-Analyse überwiegend als ergänzende Methode zur klassischen Chromosomenanalyse zu sehen. Sie wird gezielt zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen eingesetzt. Zum Ausschluss eines BCR-ABL1-Rearrangements als sichere Abgrenzung gegenüber der CML sollte bei Verdacht auf MPN immer eine FISH-Analyse und/oder eine PCR durchgeführt werden, da auch beim Fehlen einer Philadelphia-Translokation in der Chromosomenanalyse ein BCR-ABL1-Rearrangement vorliegen kann (sog. Philadelphia-negative BCR-ABL1-positive CML).

Mittels eines FISH-„Screenings“ an Interphase-Kernen würde nur ein Bruchteil der bei der MPN möglichen Aberrationen erfasst werden. Daher kann FISH die klassische Chromosomenanalyse nicht ersetzen.



## Molekulargenetik

Die Molekulargenetik hat heute den wichtigsten Stellenwert in der MPN-Diagnostik. Sie wird eingesetzt, um in allen Fällen ein *BCR-ABL1*-Rearrangement auszuschließen und dient darüber hinaus zur Abgrenzung einer MPN von einer reaktiven Veränderung sowie zur Verlaufsdagnostik. Hierfür wurden in den letzten zehn Jahren eine Vielzahl von Mutationen (v.a. *JAK2 V617F*, *MPL*, *CALR*) identifiziert (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Häufigkeit der verschiedenen Mutationen bei PV, ET und PMF (Langabeer et al., 2015)**

Gen	Häufigkeit (%)		
	PV	ET	PMF
<i>JAK2</i>	97	50-60	55-60
<i>JAK2 Exon 12</i>	1-2	selten	selten
<i>MPL</i>	selten	3-5	5-10
<i>CALR</i>	selten	20-30	25-35
<i>TET2</i>	10-20	5	10-20
<i>IDH1/2</i>	selten	selten	5
<i>DNMT3A</i>	5-10	1-5	5-10
<i>ASXL1</i>	2-5	2-5	15-30
<i>EZH2</i>	1-3	selten	5-10
<i>CBL</i>	selten	selten	5-10
<i>SF3B1</i>	selten	selten	5-10
<i>SRSF2</i>	selten	selten	10-15
<i>U2AF1</i>	selten	selten	5-15

Bei familiär auftretenden MPN lassen sich gelegentlich Mutationen in den *VHL*-, *EPOR*-, *EPAS1*- und *EGLN1*- Genen finden. Diese Mutationen sind sehr selten und sollten dann untersucht werden, wenn alle anderen Marker negativ sind, der Patient sehr jung ist und es eine positive Familienanamnese gibt.

### ***JAK2 V617F*-Mutation spielt zentrale Rolle bei der MPN-Diagnostik**

Die *V617F*-Mutation im Exon 14 des *JAK2*-Gens (Januskinase 2) hat eine zentrale Rolle in der Diagnostik der MPN eingenommen. Hierbei kommt es zu einem Austausch von Guanidin durch Thymidin an Nukleotidposition 2343, was zu einer Substitution der Aminosäure Valin an Position p.617 durch Phenylalanin führt. Diese Mutation, die in einer erhöhten Kinaseaktivität resultiert, findet sich bei etwa 96% aller PV-Patienten. *V617F*-Mutationen finden sich auch bei ca. 50% aller ET und PMF. Generell scheint eine fortgeschrittene Erkrankung mit einer höheren Mutationslast (d.h. Verhältnis Mutation/Wildtyp) einherzugehen, wobei sich die höchsten Mutationslasten bei PV und die niedrigsten bei ET finden. Homozygote *V617F*-Mutationen, die durch uniparentale Disomie entstehen, treten bei PV häufiger auf als bei ET (Stein et al., 2015).

### ***JAK2 Exon 12*-Mutationen bei *V617F*-negativer PV**

Bei etwa 80% aller *V617F*-negativen PV-Fälle finden sich Mutationen im Exon 12 des *JAK2*-Gens, die im Gegensatz zur *V617F*-Mutation heterogen sein können (Stein et al., 2015, Geyer et al., 2016). Diese Mutationen sind meistens Insertionen oder Deletionen im Bereich der Aminosäurereste 538-543, wobei seltener auch Punktmutationen (Missensemutationen) oder größere Insertionen vorliegen können. Etwa die Hälfte aller Patienten mit *JAK2 Exon12*-Mutationen weisen nicht den klassischen PV-Phänotyp auf, sondern imponieren als isolierte Erythrozytosen. Die klinische Symptomatik erscheint weniger ausgeprägt, jedoch liegen aufgrund der insgesamt geringen Häufigkeit bisher keine sicheren Daten zur Prognose vor.

### ***MPL*- und *CALR*-Mutationen bei *JAK2 V617F*-negativer PMF oder ET**

Bei den *JAK2V617F*-negativen ET und PMF finden sich bei 10-20% aller Patienten Mutationen im *MPL*-Gen, das für den Thrombopoetinrezeptor kodiert. Mutationen im *MPL*-Gen liegen fast immer an der Position W515, wobei es zu einem Austausch des Tryptophans gegen Leucin (W515L), Lysin (W515K) oder seltener auch gegen Arginin (W515R), Serin (W515S) oder Alanin (W515A) kommt. Selten finden sich auch S505N-Mutationen. Auch diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK-STAT Signalweges, die Klinik von *JAK2V617F* und *MPLW515* mutierten Patienten unterscheidet sich nicht. Analog zur *JAK2V617F*-Mutation gilt auch für die *MPL*-Mutationen, dass die Mutationslast bei der PMF in der Regel höher ist als bei der ET und bei Progression der Erkrankung zunehmen kann. Mutationen im Calreticulin-Gen (*CALR*) finden sich bei bis zu 70% der Patienten mit essentieller Thrombozythämie und bei 56-88% mit Myelofibrosen, bei denen keine *JAK2*- oder *MPL*-Mutation nachgewiesen wurde (Klampf et al., 2013, Nangalia et al., 2013).

### ***TET2*-Mutationen treten bei MPN unabhängig vom *JAK2*-Mutationsstatus auf**

Bei jeweils 10-20% aller PV und PMF sowie etwa 5% der ET wurden zudem Mutationen im *TET2*-Gen, einem Mitglied der *TET*-Onkogen-Familie, beschrieben, welche unabhängig vom *JAK2*-Mutationsstatus auftreten können. *TET2*-Mutationen finden sich in der Entstehungssequenz vor oder nach *JAK2*-Mutationen, und stellen bei MPN frühe oder auch späte Ereignisse bei der Transformation dar. Da *TET2*-Mutationen bei allen MPN-Typen



zu finden sind, erlauben sie keine Unterscheidung zwischen den Entitäten. Sie können jedoch hilfreich sein, um eine maligne Erkrankung von einer reaktiven Veränderung abzugrenzen.

### Prognose

Neben erhöhtem Alter, Leukozytose und Thrombose scheint im Allgemeinen der Nachweis chromosomaler Veränderungen bei Diagnosestellung einer MPN mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert zu sein. Das Auftreten komplexer Karyotypen im Verlauf einer MPN erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs in eine Blastenkrise (Haferlach et al., 2008). SNP-Array Analysen zeigten in der Blastenkrise gehäuft Deletionen der Gene *ETV6* (Chr. 12), *TP53* (Chr. 17) oder *RUNX1* (Chr. 21) (Thoennissen et al., 2010).

### Genmutationen beeinflussen das Risikoprofil der MPN

#### ④ Genetisches Risikoprofil bei ET

Bei ET ist das Auftreten der *JAK2V617F*-Mutation mit einem geringeren Risiko einer fibrotischen Progression assoziiert. Bei etwa 15% der Patienten liegt mindestens in einem der Gene *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2* und *EZH2* eine Mutation vor, was mit einer negativen Prognose für das Gesamtüberleben sowie das myelofibro- und leukämiefreie Überleben assoziiert ist (Tefferi et al., 2017). Das mediane Überleben von solchen Patienten liegt bei 9 Jahren im Vergleich zu 22 Jahren ohne diese Mutationen.

#### ④ Genetisches Risikoprofil bei PV:

Bei PV liegt praktisch bei allen Patienten eine *JAK2*-Mutation vor. 97% haben eine *JAK2* Exon14-Mutation (z.B. *JAK2V617F*), bei den restlichen 3% sind andere Exons betroffen. Patienten mit *JAK2V617F*- und Exon 12-Mutationen zeigen keinen Unterschied hinsichtlich des klinischen Outcomes. Bei 53% der Patienten sind neben *JAK2*-, *CALR*- oder *MPL*-Mutationen 27 weitere Genloci betroffen, am häufigsten *TET2* (22%), *ASXL1* (12%) und *SH2B3* (9%). Für Mutationen in *ASXL1*, *SRSF2* und *IDH2* besteht eine negative prognostische Assoziation mit Gesamtüberleben sowie myelofibro- und leukämiefreiem Überleben. (Tefferi et al., 2017). Das mediane Überleben von Patienten mit oder ohne solche Mutationen beträgt 7,7 bzw. 16,9 Jahre.

#### ④ Genetisches Risikoprofil bei PMF:

*CALR*- und *ASXL1*-Mutationen scheinen DIPSS Plus unabhängig mit einem günstigen bzw. ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert zu sein. Dabei zeigen Patienten mit *CALR*-Mutation in Abwesenheit einer *ASXL1*-Mutation die beste, Patienten ohne *CALR*-Mutation, jedoch mit *ASXL1*-Mutation die ungünstigste Prognose (Tefferi et al., 2014). Neben *ASXL1*-Mutationen sind Mutationen der Gene *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1* und *IDH2* unabhängig vom IPSS und DIPSS Plus mit einem kürzeren Überleben und höherem Risiko der Transformation in eine akute Leukämie assoziiert (Vannucchi et al., 2013). Dabei ist das Auftreten von zwei oder mehr Mutationen dieser Gene verglichen mit einer oder keiner Mutation prognostisch ungünstiger einzuschätzen (Guglielmelli et al., 2014). Mittels *deep sequencing*-Daten konnten jüngst weitere prognostisch ungünstige Mutationen in *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *SH2B3*, und *CEBPA* identifiziert werden (Tefferi et al., 2017). Jede dieser Mutationen stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Gesamtüberleben (3,6 Jahre mit Mutation vs. 8,5 Jahre ohne) und leukämiefreies Überleben (7-Jahresrisiko für leukämische Transformation 25% mit Mutation vs. 4% ohne) dar.

### Referenzen

Die zugehörigen Referenzen finden Sie hier:

<https://www.mll.com/erkrankungendiagnostik/myeloproliferative-neoplasien-mpn/bcr-abl1-negative-myeloproliferative-neoplasien-mpn.html#referenzen>