

Aus der Klinik III Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
am Zentrum für Innere Medizin der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med Christian Junghanß

**Etablierung und Anwendung eines *JAK2*, *MPL*, *CALR* NGS Panels
im Rahmen der Studie:
„Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten
mit abdominalen Venenthrombosen“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Luise Grunwald, geb. am 19.08.1995 in Pasewalk

aus Rostock

Rostock, 21.12.2021

Gutachter:

Prof. Dr. med. Christian Junghanß, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Uwe Walter, Universitätsmedizin Rostock

PD Dr. med. Haifa Kathrin Al-Ali, Universitätsklinikum Halle (Saale)

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Next Generation Sequencing	1
1.2 Evaluation eines Targeted-Gen-Panels.....	2
1.3 Informationsgewinn durch Next Generation Sequencing.....	3
1.4 Bedeutung von <i>JAK2</i> -, <i>MPL</i> - und <i>CALR</i> -Mutationen bei Erkrankungen	4
1.5 <i>JAK2</i>	6
1.6 <i>MPL</i> und <i>CALR</i>	8
1.7 Abdominale Venenthrombosen und molekulargenetische Untersuchung im Rahmen einer Prävalenzstudie	9
2 Ziel der Arbeit	11
3 Methoden.....	12
3.1 Material und Geräte	12
3.1.1 Geräte.....	12
3.1.2 Verbrauchsmaterial	12
3.1.3 Kommerzielle Kits.....	13
3.1.4 Reagenzien	14
3.2 Nukleinsäure-Isolierung.....	15

Inhaltsverzeichnis

3.3	Next Generation Sequencing	16
3.3.1	Ablauf	18
3.3.2	NGS Panel	19
3.3.3	Herstellung der Sequenzierungslibraries	23
3.3.3.1	Multiplex PCR-Ansatz	24
3.3.3.2	DNA-Barcode-Ligation	25
3.3.3.3	Aufreinigung der Amplikonlibraries	26
3.3.3.4	Library Konzentrationsbestimmung (Taqman)	26
3.3.4	Emulsions-PCR Ion One Touch 2 (OT2)	28
3.3.5	ISP Anreicherung Ion One Touch Enrichment System (OT-ES)	30
3.3.6	Qualitätskontrolle: Produkte der Emulsions-PCR und dem Partikel Enrichment	31
3.3.7	Sequenzierung-Ion Personal Genome Machine™	32
3.3.7.1	Initialisierung	32
3.3.7.2	Erstellung des Run Plans	33
3.3.7.3	Chipbeladung	33
3.3.8	Auswertung der NGS Daten	35
3.4	Prävalenzstudie	36
3.4.1	Probenakquise	36
3.4.2	Probeneingang	37
3.4.2.1	Datenbank für Studienpatienten	38
3.4.3	Herstellung von Blutausstrichen	39
3.4.4	Zytomorphologische Beurteilung der Blutausstriche	40
3.4.5	Befunde und Patientenbindung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Validierung des NGS Panels	42
4.1.1	Allelfrequenz der Mutation <i>JAK2</i> p.V617F - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen	42
4.1.2	Allelfrequenz der Mutation <i>MPL</i> p.W515L - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen	44
4.1.3	Allelfrequenz der Mutation <i>CALR</i> Mutation Typ 1 - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen	45
4.2	Anwendung des NGS Panels im Rahmen der Studie	47
4.2.1	Erythrozytenlyse, DNA-Isolation und Sequenzierung	47
4.2.1.1	Prävalenz von <i>JAK2</i> Mutationen	48
4.2.1.2	Prävalenz <i>MPL</i> und <i>CALR</i> Mutationen	48
4.2.2	Herkunft und Fachrichtung der einsendenden Ärzte	50
4.2.3	Charakteristik der Studienpopulation und der abdominalen Venenthrombosen	51

Inhaltsverzeichnis

4.2.4	Angegebene Symptome	52
4.2.5	Angewandte diagnostische Methoden und Therapiestrategien	53
4.2.6	Klinische Charakteristika	55
4.2.7	Charakterisierung der Patienten mit detektierter Punktmutation.....	57
4.2.8	Zytomorphologische Charakterisierung.....	57
5	Diskussion	61
5.1	Sensitives Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung von <i>JAK2</i>, <i>MPL</i>, <i>CALR</i>.....	62
5.2	Kritische Betrachtung der Probenakquise	63
5.3	Abdominale Venenthrombosen in Mecklenburg-Vorpommern	65
5.3.1	Ein Einzelfall: Hohe Allelfrequenzen	67
5.4	Bedeutung niedriger Allelfrequenzen bei abdominalen Venenthrombosen	67
5.5	Screening auf MPN bei abdominalen Venenthrombosen	70
5.6	Ausblick.....	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Thesen.....	75
8	Literaturverzeichnis	77
9	Anhang	86
9.1	Flyer zur Studie „Prävalenz von <i>JAK2</i>-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ in Mecklenburg-Vorpommern	86
9.2	Anschreiben an ärztliche Kollegen.....	87
9.3	Klinischer Fragebogen.....	88
9.4	Patienteninformation.....	89
9.5	Patienteneinverständniserklärung	90
9.6	Beispiel: Zytomorphologischer Befund	91

Inhaltsverzeichnis

9.7	Beispiel: NGS Befund	93
10	Danksagung	95
11	Eidesstattliche Versicherung	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kriterien zur Diagnose von Myeloproliferativen Neoplasien:.....	5
Tabelle 2 Beispiele <i>JAK2</i> Exon 14 Mutationen:.....	7
Tabelle 3 NCBI Identifikationsnummern der Gene <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> , <i>CALR</i>	19
Tabelle 4 Tumor-DNA Verdünnung <i>JAK2</i> p.V617F	22
Tabelle 5 Tumor-DNA Verdünnung <i>MPL</i> p.W515L	23
Tabelle 6 Tumor-DNA Verdünnung 51 bp Deletion <i>CALR</i> Typ 1.....	23
Tabelle 7 PCR Ansatz, Amplikonbibliothek	24
Tabelle 8 PCR Profil.....	24
Tabelle 9 FuPa Reaktion	25
Tabelle 10 Barcode-Ligation.....	25
Tabelle 11 <i>E. coli</i> DH10B Kontrolllibrary, Verdünnungseinstellung	27
Tabelle 12 Verdünnungen der NGS Library	27
Tabelle 13 qPCR Reaktion	28
Tabelle 14 Herstellung einer 100 mM NaOH - Lösung.....	32
Tabelle 15 Allelfrequenzen detektierter Hotspot Mutationen	49
Tabelle 16 Häufigkeiten der Lokalisationen der abdominalen Venenthrombosen	52
Tabelle 17 Klinische Beschwerden.....	53
Tabelle 18 Häufigkeiten der initial zur Therapie gewählten Antikoagulantien	55
Tabelle 19 Vorhandensein von Cofaktoren für abdominale Venenthrombosen	55
Tabelle 20 Häufigkeiten von Leberzirrhose und Thromboembolien in der Anamnese	56
Tabelle 21 Häufigkeiten von Tumorerkrankungen.....	56
Tabelle 22 Morphologische Veränderungen in den Blutausstrichen der Proben mit Nachweis der <i>JAK2</i> -Mutation im Vergleich der morphologischen Veränderungen aller Ausstriche	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Münze mit Profil der Gottheit Janus.....	6
Abbildung 2 Elongation der DNA unter Abspaltung eines Protons.....	17
Abbildung 3 Ausschnitt IGV Browser, Gesamtabdeckung <i>JAK2</i> Gen und Amplikonpositionen	20
Abbildung 4 Ausschnitt IGV Browser Gen <i>MPL</i>	21
Abbildung 5 Ausschnitt IGV Browser Gen <i>CALR</i>	21
Abbildung 6 An ein ISP gebundene Fluoreszenzstoffe Alexa Fluor™ 488 und Alexa Fluor™ 647	31
Abbildung 7 Ion Chip™ Minifuge mit Ion 318™ Chip im Chip Bucket und Chip Tab nach außen.....	34
Abbildung 8 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz für <i>JAK2</i> p.V617F	43
Abbildung 9 Ausschnitt IGV Browser, Abdeckung der 1 % Allelfrequenz- Verdünnung von <i>JAK2</i> p.V617F	43
Abbildung 10 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz <i>MPL</i> p.W515L	44
Abbildung 11 Ausschnitt IGV Browser, Abdeckung der 1 % Allelfrequenz- Verdünnung von <i>MPL</i> p.W515L	45
Abbildung 12 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz <i>CALR</i> Mutation Typ 1	46
Abbildung 13 Ausschnitte IGV Browser, Abdeckung der 5 % Allelfrequenz- Verdünnung von <i>CALR</i> Mutation Typ 1	47
Abbildung 14 Herkunft der Proben	50
Abbildung 15 Verteilung der Probeneinsendungen in Bezug auf Fachgebiete der einsendenden Ärzte.....	51
Abbildung 16 Häufigkeit der Diagnoseverfahren zur Detektion der abdominalen Venenthrombose.....	54
Abbildung 17 Verteilung der Therapiestrategien	54
Abbildung 18 Blutausstrich der Probe MPN38	58
Abbildung 19 Ausschnitt eines Blutausstriches: Riesenthrombozyt.	59
Abbildung 20 Ausschnitt eines Blutausstriches: Thrombozytenaggregat.	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21 Beispiel der Entwicklung einer AML über die Stufen des
CHIP und des MDS 70

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
AML	Akute Myeloische Leukämie
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASXL1	Additional Sex-Comb Like 1
AV	arterio-venös
bp	Basenpaare
Ca.	Carcinom
CALR	Calreticulin
CHIP	Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (Klonale Hämatopoese mit unbestimmten Potential)
COSM	Catalogue of Somatic Mutations
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribunucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure-DNS)
DNMT3A	DNA-cytosine-5-methyltransferase 3 A
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ET	Essentielle Thrombozythämie
g	Gramm
h	Stunde
hg 19	humanes Referenzgenom 19
HSA	Homo Sapiens
ISP	Ion Sphere Partikel
J	Jahr
JAK2	Janus Kinase 2
k. A.	keine Angabe
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	männlich
M	molar
max.	maximal

Abkürzungsverzeichnis

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPL	Myeloproliferative Leukämia Protein (Virus Onkogen)
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NMH	Niedermolekulares Heparin
NOAK	Neue orale Antikoagulantien
Nr.	Nummer
OP	Operation
PBS	Phosphat Buffer Solution (Phosphatpuffer – Lösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGM	Personal Genome Machine, Sequenziergerät
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polyzythämia Vera
qPCR	quantitative Echtzeit - Polymerasekettenreaktion
s. c.	subcutan
sec	Sekunden
s. o.	siehe oben
Sono	Sonographie
SOP	Standard Operating Procedure (Standardvorgehensweise)
TET2	Tet - Methylcytosindioxygenase 2
TVT	Tiefe Venenthrombose
u. a.	unter anderem
UMI	„unique molecular identifiers“ (einzigartige molekulare Identifikatoren)
US	Unterschenkel
V. a.	Verdacht auf
w	weiblich

Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organisation
x g	multipliziert mit Erdbeschleunigung
Z. n.	Zustand nach
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Next Generation Sequencing

Das umfangreiche und stetig wachsende Wissen um molekulare Aberrationen, welche für verschiedene Erkrankungen prognose- und therapieentscheidend sind, führt zu zunehmender Bedeutung und Integration genetischer Untersuchungen in die Klinik.

Einige Abschnitte des menschlichen Genoms sind durch häufige Aberrationen gekennzeichnet, die als „mutational Hotspot“ bezeichnet werden. Durch das Wissen um diese Hotspot Regionen der DNA wird die Identifikation pathogener Mutationen erleichtert. Je nach Entität der vermuteten Erkrankung können so gezielt genetische Untersuchungen von Hotspot-Regionen entsprechender Gene durchgeführt werden. Kombinationen von Aberrationen sind dabei möglich und insbesondere im Zusammenhang mit hämatologischen Pathologien häufig, sodass eine parallele Detektion von Vorteil wäre.

Die parallele Sequenzierung vieler dieser relevanten Hotspot-Regionen, gesamter proteinkodierender Sequenzen von Genen, kompletten Genomen und RNA Expressionsprofilen wird durch moderne Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden, jetzt in einer Geschwindigkeit und Kosteneffizienz ermöglicht, die eine Nutzung im klinisch diagnostischen Bereich erlauben.

Die Hochdurchsatzsequenzierungen oder auch als Next Generation Sequencing (NGS) und damit als „Sequenzierung der nächsten Generation“ benannten Methoden lösen die Sanger Sequenzierung „der ersten Generation“ in vielen Anwendungsbereichen ab. Die parallele Sequenzierung mehrerer Genabschnitte erlaubt komplexe Untersuchungen vieler potentieller Genveränderungen und macht eine Anwendung von langwierigen Stufendiagnostiken obsolet. Ein Sequenzierlauf dieser Hochdurchsatzverfahren resultiert in einem umfangreichen Informationsgewinn zum molekulargenetischen Hintergrund einer Erkrankung. So können parallel viele Genabschnitte oder auch gesamte proteinkodierende Sequenzen mehrerer Gene sequenziert werden. Ein patientenspezifisches Labeling der Proben ermöglicht diesen

Einleitung

Informationsgewinn während eines Sequenzierlaufs von vielen unterschiedlichen Proben gleichzeitig zu generieren.

Die Methode des NGS weist neben hoher Quantität der zu untersuchenden Genabschnitte auch eine sehr hohe Sensitivität auf. Eine Untersuchung ermöglicht die hochsensitive Detektion von Aberrationen in sehr vielen Genabschnitten. Es wird eine Sensitivität im niedrigen einstelligen Prozentbereich zu jeder adäquat ausgelesenen Base generiert. Die Sequenzierung mit der gängigen und weit verbreiteten Methode nach Sanger ermöglicht die spezifische Detektion von Allelfrequenzen ab ca. 20 %. Eine quantitative Realtime-PCR erlaubt, als Erweiterung dieser Methode, auch eine hochsensitive Sequenzierung im niedrigen Prozentbereich. Allerdings ist die Zahl der Mutationen, welche mit dieser Methode hoch sensitiv bestimmt werden können, auf einzelne Hotspots begrenzt.

Eine parallele Detektion von vielen pathogen-relevanten Mutationen in einem sehr geringen Prozentbereich ist aktuell mit derartiger Kosten- und Zeiteffizienz für viele Proben gleichzeitig nur über NGS-Methoden zu erreichen. Diese Möglichkeit der parallelen hochsensitiven Untersuchung von relevanten Nukleinsäureabschnitten führt zu neuen Perspektiven im Verständnis des Zusammenhangs einer Mutation und seiner klinischen Auswirkung.

Insbesondere für hämatologische Erkrankungen sind molekulargenetische Untersuchungen multipler Genabschnitte für die Therapieplanung essentiell geworden. Ein Beispiel hierfür ist die Akute myeloische Leukämie (AML). Eine Vielzahl an genetischen Mutationen auch im niedrigen Allelfrequenzbereich erklären einerseits Entstehung und Dynamik einer AML, andererseits auch das Ansprechen auf unterschiedlichste Therapiestrategien.¹

1.2 Evaluation eines Targeted-Gen-Panels

In dieser Arbeit wird das Ion Torrent Next Generation Sequencing System der Firma ThermoFisher Scientific genutzt. Der Schlüssel zur Sequenzierung unterschiedlicher Genabschnitte in einem Sequenziervorgang liegt bei diesem System in der Durchführung von Multiplex-Polymerasekettenreaktionen. Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten, welche einer Sequenzierung zugeführt werden sollen, werden diese Multiplexansätze in sogenannten „Primerpaneln“

Einleitung

verwendet. Diese NGS Panel sind eine Mischung von vielen verschiedenen Primerpaaren und können kommerziell erworben oder auch für individuelle Sequenzierinhalte vom Anwender erstellt werden. Komplexe Panel können mehrere tausend Primerpaare enthalten, beispielsweise deckt das kommerziell erhältliche Comprehensive Cancer Panel 16.000 Primerpaare in 4 Multiplex-Reaktionen ab. Die Verwendung von targeted NGS Paneln ermöglicht eine Abdeckung von zu untersuchenden Bereichen mehrfacher 1000er Frequenz. Somit bieten targeted NGS Panel die Möglichkeit, multiple erkrankungsrelevante Nukleinsäurebereiche hochsensitiv zu realisieren.

Für jedes dieser NGS Panel muss die Methode des NGS für die Gegebenheiten in einem Labor evaluiert und validiert werden. Die Sensitivität, welche durch die Verwendung der Methode NGS erreicht werden kann, ist direkt abhängig von stabilen Amplifikationseigenschaften der einzelnen Primerpaare in der Kombination des verwendeten Panels (Multiplex).

Ein speziell auf die Diagnostik Myeloproliferativer Neoplasien (MPN) ausgerichtetes Panel wurde im hämatologischen Speziallabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin am Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock erstellt. Inhalt dieses Panels sind Primerpaare zur Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR*.

1.3 Informationsgewinn durch Next Generation Sequencing

Mit der Etablierung des NGS als Hochdurchsatzsequenzierverfahren und Integration desselben in die klinische Praxis können sich neue Erkenntnisse im Zusammenhang von genetischen Veränderungen und klinischer Präsentation einer Erkrankung ergeben.

Nicht nur die Detektion bisher nicht beschriebener oder selten detektierter Genmutationen, auch die Möglichkeit des Nachweises von Mutationen mit sehr geringen Allelfrequenzen führt zur Frage der diagnostischen Einordnung dieser neuen Informationen und ihrer Wertung für das klinische Vorgehen. Während die Bedeutung vieler Mutationen in ihrer Auswirkung auf molekularer und Proteinebene bereits beschrieben sind, stellt sich die Frage nach der Bedeutung

Einleitung

insbesondere von Mutationen mit geringen Allelfrequenzen für den Krankheitsverlauf der Patienten.

1.4 Bedeutung von *JAK2*-, *MPL*- und *CALR*-Mutationen bei Erkrankungen

Abdominale Venenthrombosen sind selten, stellen für betroffene Patienten jedoch häufig schwere Komplikationen dar. Nicht selten präsentieren sie sich als erste Manifestation Myeloproliferativer Neoplasien (MPN): einer Polycythämia Vera (PV), primären Myelofibrose (PMF) oder Essentiellen Thrombozythämie (ET). Diese drei Erkrankungen stellen Veränderungen multipotenter Stammzellen dar, in etwa 60 – 70 % aller Fälle resultieren sie aus Mutationen in den Genen *JAK2*, *MPL* und *CALR*.² In der Diagnostik der MPN spielt die Molekulargenetik dementsprechend eine entscheidende Rolle.

Zu den MPN gehören laut WHO zudem die Chronische Myeloische Leukämie, die Chronische Neutrophilenleukämie und das Hypereosinophile Syndrom.³ Gekennzeichnet durch das Auftreten von Mutationen in den drei o.g. Genen sind jedoch vor allem ET, PV und PMF und werden im Folgenden weiter zusammenfassend MPN genannt. MPN werden häufig erst beim Auftreten erster Komplikationen wie beispielsweise einer abdominalen Venenthrombose diagnostiziert. Der Patient ist oft bis dahin symptomlos und auch Blutuntersuchungen können ohne erhebliche pathologische Veränderungen sein. Eine anschließende genetische Untersuchung zeigt teils hohe Allelfrequenzen der krankheitstypischen Mutationen. Tabelle 1 zeigt die Diagnosekriterien für MPN, deren Bestandteil auch je die Mutationen der Gene *JAK2*, *CALR* und *MPL* sind. Zu Beginn der MPN zeigen sie ähnliche Symptome und können klinisch kaum voneinander unterschieden werden. Bereits vor möglichen Komplikationen können jedoch auch dezente Blutbildauffälligkeiten auftreten, welchen häufig wenig Bedeutung beigemessen wird. Diese sind bereits Ausdruck einer bestehenden genetischen Veränderung der Hämatopoese.

Einleitung

Tabelle 1 Kriterien zur Diagnose von Myeloproliferativen Neoplasien: Polyzythämia Vera (PV), Essentielle Thrombozythämie (ET) und primäre Myelofibrose (PMF), modifiziert nach WHO 2016³

Kriterien zur Diagnose von		
PV	ET	PMF
Major Kriterien		
Hämoglobin > 16,5 g/dl (m); >16 g/dl (w) oder Hämatokrit > 49 % (m); > 48 % (w) oder erhöhte Erythrozytenzahl	Thrombozytenzahl > 450 x 10 ⁹ /L	Vorhandensein megakaryozytischer Proliferation und Atypie mit Retikulin- und / oder Kollagenfibrose
Panmyelose des Knochenmarks mit pleomorphen Megakaryozyten	Knochenmark mit vermehrt, vergrößerten Megakaryozyten	Ausschluss von ET, PV, BCR-ABL ⁺ , CML, MDS und anderen myeloischen Neoplasien
JAK2 p.V617F oder JAK2 Exon 12 Mutation	Ausschluss von BCR-ABL ⁺ , CML, PV, PMF, MDS, und anderen myeloischen Neoplasien	JAK2-, MPL- oder CALR-Mutation oder eines anderen klonalen Markers oder fehlende reaktive Myelofibrose
	JAK2-, CALR- oder MPL-Mutation	
Minor Kriterien		
Verminderte oder subnormale EPO-Konzentrationen im Blut	Vorhandensein einer genetischen Mutation oder fehlende Hinweise für eine reaktive Thrombozytose	Anämie unter Ausschluss anderer Ursachen
		Leukozytose > 11 x 10 ⁹ /L
		palpable Splenomegalie
		LDH Erhöhung
		Leukoerythroblastose
Diagnosekriterien erfüllt, wenn folgendes erfüllt:		
3 Major Kriterien oder die ersten zwei Major Kriterien + 1 Minor Kriterium	4 Major Kriterien oder die ersten drei Major Kriterien + das Minor Kriterium	3 Major Kriterien + 1 Minor Kriterium

Bei der ET sind primär die Megakaryozyten betroffen. Sie kommen im Knochenmark vermehrt, vergrößert und hyperloid vor, daraus resultiert eine Vermehrung und eine morphologische und funktionelle Veränderung der Thrombozyten.

Die PV zeichnet sich vorrangig durch die Erhöhung der Erythrozytenzahl aus. Klinische Gemeinsamkeiten sind Mikrozirkulationsstörungen, sowie thromboembolische und hämorrhagische Komplikationen. Die primäre Myelofibrose bezeichnet die Fibrosierung des Knochenmarks ohne Vorerkrankungen. Möglich ist auch die Entstehung einer sekundären Fibrose, bezeichnet als Post-ET- und die Post-PV-Myelofibrose. Allen Myelofibrose-Erkrankungen gemeinsam ist eine ausgeprägte Expansion des

Einleitung

Knochenmarkstromas mit daraus folgender Osteosklerose, Neoangiogenese, leukoerythroblastischer Anämie und zunehmender massiver Splenomegalie.⁴

Die Methoden des NGS ermöglichen eine Detektion von Aberrationen in einem breiten Feld von Patientenmaterial und Genen. Krankheitssymptome und abdominale Venenthrombosen in Zusammenhang mit MPN können sich auch bei Aberrationen in niedrigfrequentem Bereich zeigen, sodass die Erhebung eines „Cut offs“ für die Pathologie einer Aberration nicht sinnvoll ist. Eine Einordnung in ein MPN passiert so weiterhin nur in Zusammenschau hämatologischer, molekulargenetischer und klinischer Befunde (siehe Tabelle 1).

1.5 JAK2

Mutationen im *JAK2* Gen bewirken eine Veränderung in der Aktivität der gleichnamigen Janus Kinase 2 (JAK2).

Wie auch ihr Namensgeber die mythologische Gottheit Janus (Abbildung 1), zeichnen sich die Janus Kinasen durch eine Doppelgesichtigkeit aus. Die Doppelgesichtigkeit entsteht durch den Besitz einer Kinase- und einer Pseudokinasedomäne. Durch die konstitutive Assoziation an membranständigen Rezeptoren, wie z.B. dem Wachstumshormonrezeptor sowie



Abbildung 1 Münze mit Profil der Gottheit Janus modifiziert nach <http://deacademic.com/dic.nsf/dewiki/682935> Zugriff am 11.02.2019

vielen Interleukin- und Interferonrezeptoren, haben sie mit ihrem Namensgeber auch die Türwächtereigenschaft gemeinsam. JAK2 ist durch ihre Einbindung im JAK/STAT Signalweg an der Regulation des Zellwachstums, der Zellentwicklung und der Homöostase beteiligt. Dabei hat JAK2 u.a. bei der Transkriptionsregulation einiger Signalproteine Anteil, die in erster Linie in der Hämatopoese eine große Rolle spielen: IFN γ , IL-3, IL-5, GM-CSF, EPO, TPO, G-CSF, Leptin.⁵

Die Pseudokinase JH2 vermittelt eine Verminderung der Kinaseaktivität von JAK2 und damit folgend eine Regulation der von JAK2 beeinflussten Signalwegen.

Einleitung

Die MPN-verursachenden Mutationen im *JAK2* Gen behindern die katalytische Funktion der *JAK2*-Pseudokinasedomäne und heben somit ihre inhibitorische regulatorische Funktion auf. Es kommt zu einer vermehrten basalen Aktivität der *JAK2*-Kinasedomäne.⁶ Die Zellhomöostase ist folglich gestört, es entsteht das Krankheitsbild der MPN.⁵

Der Mutationsstatus der *JAK2* Punktmutation p.V617F (c.1849G>T in Exon 14) ist von den genetischen Diagnosekriterien MPN das häufigste:³ Mit circa 97 % aller Fälle weisen fast alle an einer PV erkrankten Patienten die *JAK2* p.V617F Mutationen auf. Bei der ET wird diese Mutation in bis zu 60 % der Fälle detektiert. Die PMF weist ebenfalls in etwa 50 – 60 % die *JAK2* p.V617F Mutation auf.^{2,7–10} Das *JAK2* Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms HSA 9 (GRCh38/hg38 Position: chr9:4,985,245-5,128,183) und setzt sich aus 25 Exons zusammen.

Die Detektion der Punktmutation p.V617F im *JAK2* Gen wurde 2005 von mehreren Arbeitsgruppen erstmalig beschrieben.^{7,8,9} Sie stellt die häufigste *JAK2* Punktmutation dar und ist ein Basenaustausch c.1849G>T in Exon 14 (COSM 12600). Das Auslesen des Basentriplets führt anschließend zum Einbau der Aminosäure Phenylalanin anstelle eines Valins in der Aminosäureposition 617 (p.V617F). In darauffolgenden Jahren wurden weitere Mutationen in Exon 14 beschrieben. Tabelle 2 zeigt ausgewählte Kombinationen von Punktmutationen des *JAK2* Gens in Exon 14.

Tabelle 2 Beispiele *JAK2* Exon 14 Mutationen: Häufigkeit bei Myeloproliferativen Neoplasien²

Punktmutation	Häufigkeit des Auftretens
p.V617F; p.D620E	<1 % MPN
p.V617F; p.C618R	<1 % PV
p.V617F; p.L611C	<1 % PV

Das gesamte *JAK2* Gen kann von Mutationen betroffen sein. Ein weiterer Genabschnitt, welcher überdurchschnittlich häufig von Mutationen betroffen ist, ist das Exon 12 des *JAK2* Gens. Die Exon 12 betreffenden Mutationen sind deutlich seltener als die *JAK2* Hauptmutation auf Exon 14 und stellen sich hauptsächlich als Deletionen, Substitutionen und Duplikate dar. Nur etwa 4 % der von PV betroffenen Erwachsenen weisen eine Mutation in Exon 12 auf.

Einleitung

Durch Veränderungen der DNA Leseraster resultieren auch diese Mutationen in einer vermehrten Aktivität der JAK2.¹¹

1.6 *MPL* und *CALR*

Das *MPL* Gen kodiert für den Thrombopoetin Rezeptor, welcher den gleichnamigen Signalstoff bindet. Der Thrombopoetin Rezeptor ist an der Entwicklung der Megakaryozyten, der Regulation der Thrombozytenzahl und an Prozessen der Homöostase der hämatologischen Stammzellen beteiligt. Die Janus Kinase 2 ist u.a. auch an den Thrombopoetin Rezeptor assoziiert.

Das *MPL* Gen liegt auf Chromosom HSA 1, in Exon 10 treten (GRCh38/hg38 Position: chr1:43,337,849-43,352,772) die zwei am häufigsten beschriebenen Mutationen, das *MPL* Gen betreffend auf: p.W515L (hier kommt es zu einem Basenaustausch G>T an Stelle 1544) und p.W515K (hier kommt es zu einem Basenaustausch T>A an Stelle 1543 oder G>A an Stelle 1544). Infolgedessen wird während der Translation die Aminosäure Leucin bzw. Lysin statt Tryptophan in den entstehenden Aminosäurestrang eingebaut. Es resultiert der Verlust der Autoinhibition des Rezeptors bei ungebundenem Liganden.² Neben den häufigsten Punktmutationen p.W515L und p.W515K sind an diesem Hotspot weitere Mutationen bekannt, beispielsweise:

p.W515R c.1543 T>C

p.W515A c.1543 T>G; c.1544 G>C

p.W515S c.1544 G>C

Überdies sind an weiteren Hotspots ebenfalls unterschiedliche Mutationen beschrieben, z.B.:

p.S505N c.1514G>A

p.A506T c.1516 G>A

p.A519T c.1555 G>A

Calreticulin (*CALR*) ist ein Proteinkomplex, welcher sowohl auf der Zelloberfläche als auch in der Zellmatrix und im endoplasmatischen Retikulum vorkommt und vielseitige Aufgaben übernimmt. Im endoplasmatischem Retikulum eukaryoter Zellen dient es als Chaperon zur Proteinfaltung und als wichtiger Mediator der Calciumhomöostase. Außerhalb des endoplasmatischen Retikulums hat es Teil

Einleitung

an der Zelladhäsion, Zellmigration, Phagozytose und der Fibrogenese.¹² Die Entdeckung von *CALR* Mutationen im Zusammenhang mit der ET und der PMF lässt zusätzlich auf eine komplexe Interaktion von Calreticulin bei Signaltransduktionsmechanismen schließen.

Im Jahr 2013 wurden bei Patienten mit MPN und nicht mutierter *JAK2* und *MPL* Frameshift Mutationen des *CALR* Gens (GRCh38/hg38 Position: chr19:12,938,607-12,944,489) beschrieben.¹³ Etwa 70 % der Patienten ohne Veränderungen in den Genen *JAK2* und *MPL* weisen eine Mutation im *CALR* Gen auf (20 – 30 % aller Patienten mit MPN).^{13,14} Das *CALR* Gen liegt auf Chromosom HSA 19. Schon 2017 waren über 50 Mutationen des *CALR* Gens beschrieben. 80 % der Fälle von *CALR* Mutationen können zu zwei Mutationstypen zusammengefasst werden. Die Typ 1 *CALR* Mutation ist eine 52 Basenpaare betreffende Deletion (c.1092_1143del), die Typ 2 *CALR* Mutation hingegen ist eine Insertion von 5 Basen (c.1154_1155insTTGTC).^{13–15}

Wie auch die beiden Haupttypen betreffen alle beschriebenen Mutationen Exon 9 und sind Insertionen und Deletionen, die zu einer Frameshift Mutation führen. Der Frameshift resultiert in allen Fällen in der Ausbildung einer mutationsspezifischen C-terminalen Veränderung von *CALR*.¹⁵

1.7 Abdominale Venenthrombosen und molekulargenetische Untersuchung im Rahmen einer Prävalenzstudie

Eine abdominale Venenthrombose kann als erstes Symptom weit vor den anderen klinischen Manifestationen von MPN auftreten. Allgemein sind thromboembolische Ereignisse in dieser Krankheitsgruppe die am meisten gefürchtete Komplikation und eine häufige Todesursache.¹⁶

Zu den abdominalen Venenthrombosen werden in der Literatur die Thrombosen der Lebervenen (u. a. das Budd-Chiari Syndrom mit einer Inzidenz in der Gesamtbevölkerung von 0,8 / 1 Mio. Einwohner pro Jahr¹⁷), der Portalvenen mit einer Inzidenz von 7 / 1 Mio. Einwohner pro Jahr¹⁸ und der Mesenterialvenen mit einer Inzidenz von 27 / 1 Mio. Einwohner pro Jahr¹⁹ gezählt.

Aus klinischer Sicht findet sich häufig keine Ursache für abdominale Venenthrombosen. Diese Thrombosen werden jedoch durch verbesserte bildgebende Verfahren zunehmend diagnostiziert, obwohl Symptome oft

Einleitung

unspezifisch sind. In den meisten Fällen führen insbesondere die Folgen der Thrombosierungen zu einer hohen Krankheitslast für die Patienten. Im Flächenland Mecklenburg-Vorpommern verteilen sich die Patienten in den verschiedenen Kliniken mit unterschiedlicher Größe/unterschiedlichen Schwerpunkten. Eine molekulargenetische Untersuchung bei abdominalen Venenthrombosen wird in der Literatur zunehmend beschrieben, ist jedoch im Flächenland Mecklenburg-Vorpommern in weiten Landesteilen nicht verfügbar.

In der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin am Zentrum für Innere Medizin der Universität Rostock wurde eine Prävalenzstudie mit Schwerpunkt abdominalen Venenthrombosen und MPN typischen Mutationen initiiert: „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“

Im Rahmen dieser Studie fand auch das im hämatologischen Speziallabor designte NGS Panel Anwendung, sodass Daten zu Mutationen von *JAK2*, *MPL* und *CALR* generiert wurden.

2 Ziel der Arbeit

Die folgende Arbeit widmet sich zwei Hauptfragestellungen, die sich aufeinander beziehen.

Einerseits war es ein Anliegen die hochsensitive Methode des NGS zu etablieren, insbesondere für die Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenzen der Gene *JAK2*, *MPN* und *CALR*. Es galt die Sensitivität und die Performance eines designten NGS Panels zu untersuchen und dieses für seine Anwendung zu validieren.

Des Weiteren wurde dieses NGS Panel in der Studie „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ eingesetzt, um Patienten aus Mecklenburg-Vorpommern mit der klinischen Diagnose einer abdominalen Venenthrombose bezüglich o. g. Mutationen zu untersuchen. Hier wurde die Methode des NGS mit ihren Vorteilen des Hochdurchsatzes von Proben bei gleichzeitig sehr hoher Sensivität genutzt. Während eines Untersuchungsganges konnten so parallel viele Genabschnitte von unterschiedlichen Patienten analysiert werden. In einer Zeitspanne von maximal 4 Wochen erhielten die einsendenden Kollegen und Kolleginnen den Befund zur Besprechung mit dem Patienten und ggf. weiterer Therapieplanung. Um ein vollumfängliches Bild der abdominalen Venenthrombosen, deren klinischer Präsentation und der genetischen Varianz der *JAK2*, *MPN* und *CALR* Gene darstellen zu können, wurden die Einschlusskriterien der Prävalenzstudie breit gefasst. Diese Daten zur Prävalenz wurden ergänzt durch die Detektion der Mutationen in niedrigen Allelfrequenzen, was aufgrund der Verwendung der NGS Methode mit belegter hoher Sensitivität in dieser Studie möglich war.

3 Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Geräte

Absauganlage

Centrifuge 5418 R	Eppendorf
Magnetisches Rack DynaMag-2	Thermo Fisher Scientific
Thermoblock, Thermomixer 5436	Eppendorf
Ion Chip™ Minifuge	Thermo Fisher Scientific
Ion One Touch 2 System	Thermo Fisher Scientific
Ion One Touch ES	Thermo Fisher Scientific
Ion Personal Genome Machine™ System	Thermo Fisher Scientific
J6 – Mi Centrifuge	Beckman
PCR Hood	
Pipetten Rainin, Pipet Lite XLS (200 µl, 10 µl)	Mettler Toledo
Pipettensatz (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl, 2.5 µl)	Eppendorf
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Reinstwasseranlage ELGA Pro Flex3	Veolia
Sicherheitswerkbank Herasafe HS	Heraeus Instruments
Thermocycler ProFlex	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler T-Personal 48	Biometra
Tischzentrifuge Sprout™	Biozym
ViiA™ 7 Realtime PCR System - Taqman	Thermo Fisher Scientific
Vortex 1	IKA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
Hämatologie Analysesystem Sysmex XP – 300	Sysmex

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen mit Filter (1250 µl, 300 µl, 100 µl, 10 µl)	Biozym
Pipettenspitzen mit Filter Rainin (200 µl, 10 µl)	Mettler Toledo
MicroAmp® Fast Optical 96- Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific

Methoden

Reaktionsgefäße DNA LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf
Vacuumfiltersystem Stericup-GV	
0,22 µm, PVDF, 1000 ml, -sterilisiert	Merck
Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific
Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific
Non PP Tube 0,2 ml	VWR
Axygen Tubes	
Reaktionsgefäße 5 ml	Eppendorf
PCR Tubes	Eppendorf

3.1.3 Kommerzielle Kits

Nucleospin Tissue® Kit	Macherey Nagel
QuBit™ dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit	Thermo Fisher Scientific
bestehend aus:	
Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Reagents	
Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Solutions	
Ion PGM™ OT2 Supplies	
Ion PGM™ Enrichment Beads	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
bestehend aus:	
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing supplies	
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing solutions	
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing dNTPs	
Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagents	
Ion 316™ Chip Kit v2 BC	Thermo Fisher Scientific
Ion 318™ Chip Kit v2 BC	Thermo Fisher Scientific
Ion PGM™ Wash 2 Bottle Kit	Thermo Fisher Scientific
Ion Sphere™ Quality Control Kit	Thermo Fisher Scientific

Methoden

3.1.4 Reagenzien

PBS Puffer, steril, mit Mg ⁺⁺ und Ca ⁺⁺	Sigma
NH ₄ CL	Merck
Wasser (RNase/DNase frei)	Ambion
Agencourt® AMPure® XP Reagent	Beckman Coulter
MPN – Panel – Pool	Thermo Fisher Scientific
10 M NaOH – Lösung für die Molekularbiologie	Sigma
May – Grünwalds Eosin – Methylenblau	Merck
Giemsas Azur – Eosin – Methylenblau	Merck
Färbepuffer pH: 6,88	Roth
Immersionsöl	Merck
Ethanol absolut für die Molekularbiologie	Applichem
70 % Ethanol: 3,65 ml Ethanol absolut; 1,35 ml Nuklease-freies Wasser	

3.2 Nukleinsäure-Isolierung

Zur Reinigung der Blutprobe von Erythrozyten und weiteren nicht DNA-haltigen Blutbestandteilen wurden Erythrozyten lysiert und die Probe aufgereinigt.

Für die Lyse von Erythrozyten wurden 13,4 g Ammoniumchlorid eingewogen und mit Aqua dest. auf einen Liter Ammoniumchlorid-haltige Lösung (0,25 mM) aufgefüllt und autoklaviert.

Es wurden 40 ml 0,25 mM Ammoniumchlorid-haltige Lösung auf 37°C vorgewärmt, anschließend wurden 5 ml der Blutprobe hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 500 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 ml PBS-Puffer gelöst. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 500 x g fand eine Trennung des Pellets von restlichen nichtzellulären Blutbestandteilen und Erythrozytenresten aufgrund ihrer Dichteunterschiede statt. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellpellet je nach Größe in 3 – 10 ml PBS Puffer gelöst und eine Bestimmung der Zellzahl (Hämatologie-Analysesystem Sysmex XP-300) durchgeführt. Jeweils 10^7 Zellen wurden in zwei sterile 1,5 ml DNA LoBind Eppendorf Tubes überführt. Nach Zentrifugation bei 11.000 x g für 3 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets bei -20°C gelagert.

Zur DNA-Isolation wurde das Kit NucleoSpin® Tissue der Firma Macherey-Nagel genutzt. Es wurde nach dem User manual „Genomic DNA from tissue“ NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel – 01/2017, Rev. 17, ab Seite 20 vorgegangen. Modifizierend wurde in 30 µl Nuklease freies Wasser eluiert.

Zu dem aufgetauten Zellpellet wurden 200 µl T1 Lysepuffer, 25 µl Proteinase K und 200 µl des B3 Lysepuffers gegeben. Auf das 30-sekündige Vortexen folgte eine Inkubation für 15 min bei 70°C und 300 x g im Thermoblock. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 210 µl 96 % Ethanol absolut zu der lysierten Probe. Durch das Ethanol absolut wurde die DNA ausgefällt, ein 30 sekündiges Vortexen optimierte diesen Vorgang.

Ein Silica-Membran tragendes Column Tube wurde in ein Collection Tube des Kits gegeben und die Probensuspension wurde auf die Säule des Column Tubes aufgebracht. Bei der anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g durchlief die Probensuspension die Säule des Column Tubes, dabei wurde die gefällte DNA an der DNA-affinen Silica-Membran gebunden. Der Durchfluss im

Methoden

Collection Tube wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer BW auf die Säule aufgetragen. Durch eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g wurde der Waschpuffer BW durch die Säule geschwemmt, dadurch konnte die DNA-Affinität der Silica-Membran in der Säule des Column Tubes gesteigert werden. Das Aufbringen von 600 µl Waschpuffer B5 auf die Säule des Column Tubes und die anschließende Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g diente dem Auswaschen von eventuell in der Membran gebundenen Fremdstoffen und Zellbestandteilen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zentrifugation wiederholt. Nach dem so erfolgten Trocknen der Membran wurde das Column Tube auf ein steriles 1,5 ml DNA LoBind Reaktionsgefäß gesetzt. Entgegen den Herstellerangaben wurde die DNA nicht in Elution Buffer sondern in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen, da die im Elution Buffer enthaltenen Salze die Polymerase der Multiplex PCR (siehe 3.3.3.1) inhibieren können. Es wurden 30 µl Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g gelangte die gelöste DNA in das Eppendorf Tube und es erfolgte die Lagerung bei -20°C.

3.3 Next Generation Sequencing

Bei der in dieser Arbeit genutzten Plattform des NGS handelt es sich um die Ion Personal Genome Machine™ (PGM) der Firma Thermo Fisher Scientific.

Nach der Ligation der amplifizierten Nukleinsäurebereiche der Proben an Barcode-Sequenzen erfolgt die Bindung und Amplifikation an Mikrospheres, welche später in die Mikrowells eines Sequenzierchips aufgebracht werden.

Sequenziert wird bei diesem Verfahren des Next Generation Sequencings durch die Detektion einer pH-Wert Veränderung während der Synthese des Leitstrangs.

Die Desoxyribonukleotide werden während des Sequenzierlaufes alternierend über den Sequenzierchip gespült. Ist das Desoxyribonukleotid komplementär zum Matrizenstrang entsteht durch eine DNA-Polymerase eine Phosphodiesterbindung. Abbildung 2 zeigt die durch die DNA-Polymerase katalysierte Reaktion unter Abspaltung eines Pyrophosphats und eines Protons (H⁺). Dieser Reaktion erfolgt gleichzeitig an allen Amplifikaten an einem Mikrosphere, die dabei freiwerdenden Protonen bewirken eine pH-Wert-

Methoden

Änderung in den Mikrowells. Die Änderung des pH-Werts wird von der Sequenziermaschine detektiert und als Vorhandensein („Read“) einer spezifischen Base ausgelesen.

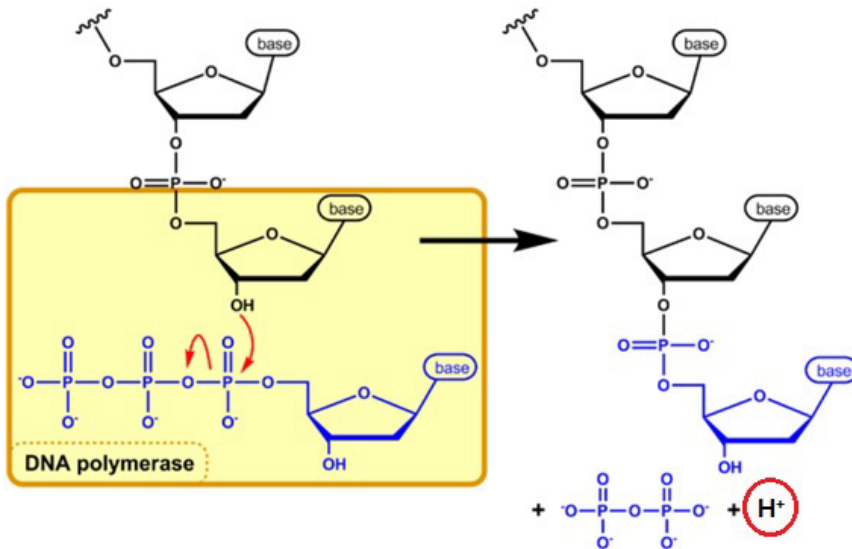


Abbildung 2 Elongation der DNA unter Abspaltung eines Protons- die durch die DNA-Polymerase vermittelte Reaktion führt zur Freisetzung eines Protons (roter Kreis). Eine Vielzahl paralleler Reaktionen führen zu einer messbarer pH-Wert Veränderung, welche eine Sequenzierung ermöglicht. Abb. modifiziert nach https://static1.squarespace.com/static/52668d02e4b0f593739ec2b6/t/534c685ae4b4cb7d17632f8/1397516378833/640px-DNA_synthesis_EN.png?format=750w, Zugriff am: 11.02.2019

Methoden

3.3.1 Ablauf

Den Methodenablauf mit Aufarbeitung der Blutprobe des bis hin zur Sequenzierung zeigt folgendes Abbildungsschema. Anschließend folgt die ausführliche Methodenbeschreibung.

i. Patientenprobe EDTA-Blut



Erythrozytenlyse



Lyse Bindung Waschschrift(e) Elution



DNA – Isolation



ii. DNA Konzentrationsbestimmung

Qubit Fluorometer 2.0



iii. Multiplex PCR mit 10 ng genomischer DNA



iv. Fertigstellung Sequenzierungslibraries

Primerrückverbau → Barcode-Ligation → Aufreinigung



v. Library-Konzentrationsbestimmung

Taqman ViiA™ 7



vi. Emulsions-PCR (OT2)



vii. ISP Anreicherung (OT-ES)



viii. Chip-Beladung



ix. Sequenzierung (Ion PGM)



x. Datenauswertung



Bildquellen: <https://www.mn-net.com/ProductsBioanalysis/DNAandRNApurification/DNA/DNAfromtissueandcells/NucleoSpinTissueXS/tabid/10645/language/en-US/Default.aspx>;
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays/myqubit/myqubit-2.html>,
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4453537>, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4474779>, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/clinical/diagnostic-testing/instruments-automation/genetic-analysis-instruments/ion-pgm-dx.html>, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4488149>,
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4488150>, Zugriff am 11.02.2019

3.3.2 NGS Panel

Für die Amplifikation der proteinkodierenden Sequenzen der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* der Patientenproben wurde ein im Haus zusammengestelltes NGS Panel verwendet. Es besteht aus zwei Primerpools mit jeweils 41 Primerpaaren. Die gesamte proteinkodierende Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* wurde durch die verschiedenen Amplifikate des genutzten NGS Panels abgedeckt. Tabelle 3 zeigt die NCBI-Identifikationsnummern des für das Panel verwendete Referenzgens.

Tabelle 3 NCBI Identifikationsnummern der Gene *JAK2*, *MPL*, *CALR*

Gen	NCBI-Identifikationsnummer
<i>JAK2</i>	NC_000009.12
<i>MPL</i>	NC_000019.10
<i>CALR</i>	NC_000001.11

Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Abdeckung der gesamten proteinkodierenden Sequenz von *JAK2* in der Darstellung des IGV Browsers. Die Amplikonpositionen sind entsprechend dem humanen Referenzgenom hg19 dargestellt. Exemplarisch vergrößert gezeigt, ist der Genausschnitt Exon 14 inklusive des Ortes der *JAK2* Hauptmutation p.V617F und deren Abdeckung durch ein Amplikon. Abbildung 4 und Abbildung 5 stellen die Abdeckung der gesamten proteinkodierenden Sequenzen der Gene *MPL* und *CALR* dar.

Methoden



Abbildung 3 Ausschnitt IGV Browser, Gesamtabdeckung *JAK2* Gen und Amplikonpositionen am humanen Referenzgenom hg19, Abdeckung über Exon 14 durch ein Amplikon

Methoden

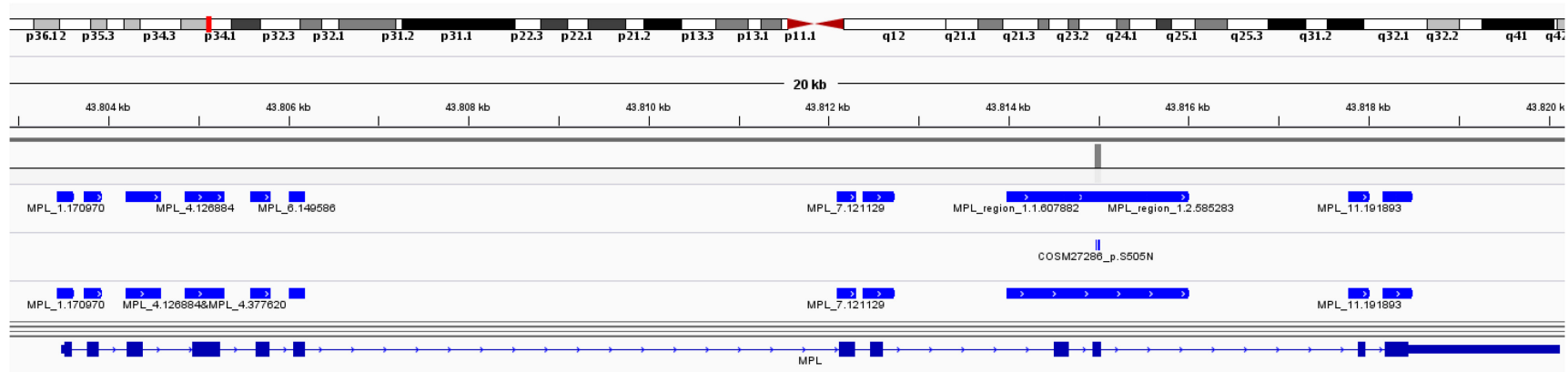


Abbildung 4 Ausschnitt IGV Browser Gen *MPL* und Amplikonpositionen am humanen Referenzgenom hg19

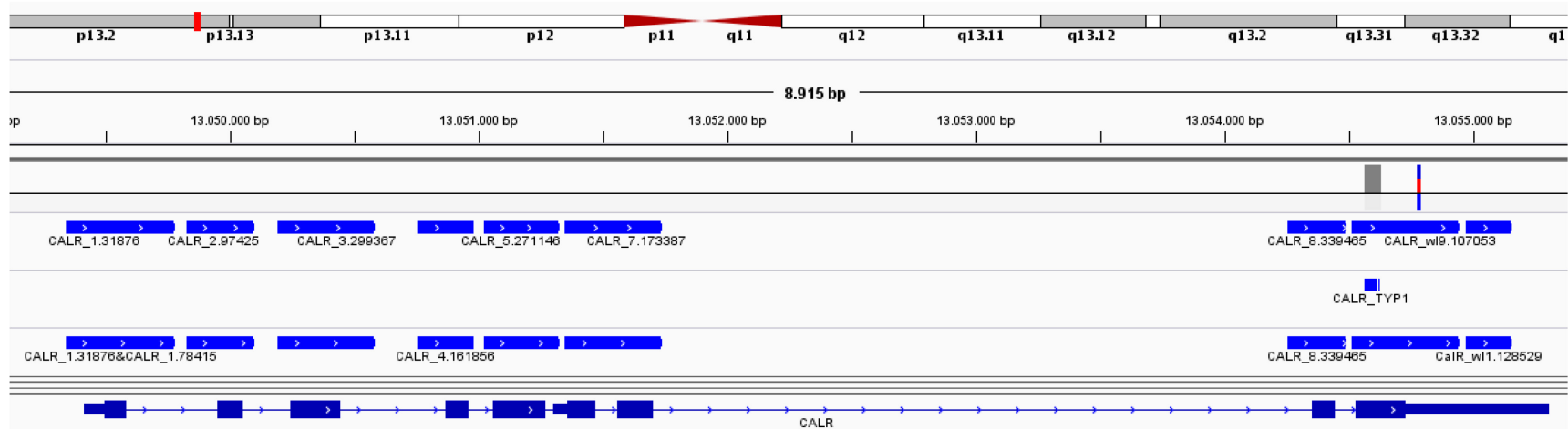


Abbildung 5 Ausschnitt IGV Browser Gen *CALR* und Amplikonpositionen am humanen Referenzgenom hg19

Methoden

Die Validierung des NGS Panels wurde mit Tumor DNA mit bekannter Allelfrequenz durchgeführt, die in den Genen *JAK2*-, *MPL*- und *CALR*-Mutationen aufwies. Es handelte sich je um eine Probe mit einer Punktmutation im *JAK2* Gen p.V617F (COSM 12600), eine Probe mit der Punktmutation im *MPL* Gen p.W515L (COSM 18918) und eine Probe mit einer 51 bp Deletion im *CALR* Gen (Mutationstyp 1 – COSM 1738055).

Zur Validierung und Festlegung eines Cut off Levels für die Detektion dieser Mutationen mit dem NGS Panel wurden Tumor-DNA Verdünnungen mittels einer Referenz-DNA eines an den Genorten nicht veränderten Spenders hergestellt. Alle DNA-Proben wurden in einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl verwendet (Messung am Qubit siehe 3.3.3), um die Mutationslasten der Proben auf 50 %, 25 %, 12.5 %, 5 % und 1 % zu verdünnen. Die Tumor-DNA Verdünnungen wurden, wie in Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt, hergestellt und jeweils wie ab 3.3.3 in der Library Preparation verwendet.

Die Allelfrequenz der *JAK2* p.V617F Mutation tragenden DNA betrug initial 96 %. Es wurden folgende Tumor-DNA Verdünnungen erstellt (Tabelle 4).

Tabelle 4 Tumor-DNA Verdünnung *JAK2* p.V617F

Allelfrequenz	Volumen der Tumor-DNA	Volumen der Referenz-DNA
50 %	10 µl (96 % Allelfrequenz)	10 µl
25 %	5 µl (96 % Allelfrequenz)	15 µl
12.5 %	5 µl (25 % Allelfrequenz)	5 µl
5 %	3 µl (25 % Allelfrequenz)	12 µl
1 %	3 µl (5 % Allelfrequenz)	12 µl

Die Allelfrequenz der *MPL* p.W515L Mutation tragenden Probe betrug initial 59 %. Es wurden folgende Tumor-DNA Verdünnungen erstellt. (Tabelle 5)

Methoden

Tabelle 5 Tumor-DNA Verdünnung *MPL* p.W515L

Allelfrequenz	Volumen der Tumor DNA	Volumen der Referenz-DNA
50 %	9 µl (59 % Allelfrequenz)	1 µl
25 %	4 µl (59 % Allelfrequenz)	6 µl
12.5 %	2 µl (59 % Allelfrequenz)	8 µl
5 %	2 µl (25 % Allelfrequenz)	8 µl
1 %	2 µl (5 % Allelfrequenz)	8 µl

Die Allelfrequenz der 51 bp Deletion *CALR* Typ 1 tragenden Probe betrug initial 46 %. Es wurden folgende Tumor-DNA Verdünnungen erstellt (Tabelle 6)

Tabelle 6 Tumor-DNA Verdünnung 51 bp Deletion *CALR* Typ 1

Allelfrequenz	Volumen der Tumor DNA	Volumen der Referenz-DNA
25 %	11 µl (46 % Allelfrequenz)	9 µl
12.5 %	4 µl (25 % Allelfrequenz)	4 µl
5 %	2 µl (25 % Allelfrequenz)	8 µl
1 %	2 µl (5 % Allelfrequenz)	8 µl

3.3.3 Herstellung der Sequenzierungslibraries

Zur Sequenzierung der Proben wurde eine Amplikon-Bibliothek hergestellt, im folgenden Library genannt.

Die Einstellung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer und dem QuBit™ dsDNA Assay Kit. Für den Messvorgang wurde zunächst eine Working Solution aus 199 µl QuBit™ dsDNA HS Buffer und 1 µl QuBit™ dsDNA HS Reagent pro Messung hergestellt. Es wurden täglich DNA Standards entsprechend der Kit- und Gerätevorgabe eingemessen, dazu wurden 190 µl Working Solution mit je 10 µl des Standards 1 bzw. 2 aus dem Kit in einem Qubit™ Assay Tube vermischt und gemessen. Anschließend konnten Probenmessungen erfolgen. Es wurden 199 µl der Working Solution mit je 1 µl der Probe bzw. deren Verdünnungen ebenfalls gut gemischt und gemessen. Für den Einsatz in die Multiplex-PCR wurden 10 ng der Proben-DNA benötigt. Um den Pipettierfehler gering zu halten, wurden die Proben auf eine DNA-

Methoden

Konzentration von 5 ng/ μ l eingestellt, sodass 2 μ l Probenvolumen pipettiert werden konnte.

3.3.3.1 Multiplex PCR-Ansatz

Die Library Präparation erfolgte mit dem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0. Der PCR-Ansatz für die Amplifikation der DNA-Targets wurde in PCR Tubes von Eppendorf unter einer PCR Hood pipettiert. Das angewandte NGS Panel besteht aus zwei Primerpanelpools, sodass für jede Probe zwei Ansätze pipettiert werden mussten. Die Zusammensetzung der Ansätze zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7 PCR Ansatz, Amplikonbibliothek

	Menge
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4 μ l
Primerpool 1 bzw. 2	10 μ l
DNA-Probe 10 ng DNA	x μ l
Nuklease freies Wasser	x μ l
Gesamt	20 μ l

Das Programm am Thermocycler zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschnitte zeigt Tabelle 8. Die Anzahl der Zyklen, sowie die Annealingtemperatur wurde durch die Anzahl der Primer des Panels bestimmt.

Tabelle 8 PCR Profil

		Temperatur	Zeit
	Enzymaktivierung	99°C	2 min
PCR Zyklen 20x	Denaturierung	99°C	15 sec.
	Annealing	60°C	4 min
	Extension		
	Halten	10°C	über Nacht

Anschließend erfolgte ein Rückverdau der Primer mittels Enzym FuPa, dazu wurde zu jedem PCR-Ansatz 2 μ l FuPa Reagent aus dem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 gegeben.

Methoden

Den Ablauf der FuPa Reaktion im Thermocycler zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9 FuPa Reaktion

Temperatur	Zeit
50°C	10 min
55°C	10 min
60°C	20 min
10°C	max. 1 h

3.3.3.2 DNA-Barcode-Ligation

Zur späteren Identifikation der einzelnen Proben auf dem Chip wurden diese mit DNA-Barcodes versehen, welche eine genaue Zuordnung der Sequenzierungsdaten zu Probennummern erlaubten.

Es wurde das Ion Xpress™ Barcode Adapter Kit verwendet, um Barcode Mixes für die Ligation herzustellen. Der Barcode-Mix wurde aus 4 µl Nuklease-freiem Wasser, 2 µl Ion P1 Adapter und 2 µl Ion Xpress™ Barcode X¹ hergestellt, nach jedem Barcode wurden neue Handschuhe verwendet.

Für die Ligation der Proben wurde zusätzlich das Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 genutzt. Es wurde zu jeder Probe 4 µl Switch Solution gegeben und anschließend zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen nur diejenigen Tubes geöffnet, welche identische Barcodes erhalten sollten. Für die Ligation wurden 2 µl des Barcode Mixes und 2 µl Ligase aus dem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 zu dem jeweiligen PCR-Ansatz pipettiert. Bei der Arbeit mit mehreren Proben wurden die Handschuhe nach jeder Probe gewechselt. Die Ligation erfolgte enzymatisch unter Ablauf des in Tabelle 10 dargestellten Programms mit Hilfe eines Thermocyclers.

Tabelle 10 Barcode-Ligation

Temperatur	Zeit
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	∞

3.3.3.3 Aufreinigung der Amplikonlibraries

Zur Entfernung von PCR-Reagenzien und Fremdstoffen erfolgte eine Aufreinigung der Libraries mittels DNA-affiner Magnetbeads unter Verwendung des Agencourt® AMPure® XP Reagent. Für die Waschvorgänge wurde 70 % Ethanol frisch angesetzt. Die Magnetbeads wurden vor Verwendung durch Vortexen gemischt und je 45 µl zu den PCR-Produkten gegeben. Nach gründlichem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde das Proben-Bead-Gemisch in ein steriles 1,5 ml DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die Bindung der DNA an die Magnetbeads erfolgen konnte. Die Reaktionsgefäße wurden in ein magnetisches Rack überführt, dort erfolgte eine Inkubation für zwei Minuten. Die Magnetbeads mit der an ihnen gebundene DNA bildeten ein leicht lösliches Pellet an der Gefäßwand zum magnetischen Rack. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das DNA-Bead-Pellet sofort in 150 µl 70% Ethanol gelöst und für 2 min im magnetischen Rack inkubiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde dieser Waschschrift wiederholt und anschließend das gesamte Ethanol aus dem Tube entfernt. Es erfolgte eine kurze Zentrifugation und im magnetischen Rack die Abnahme des erneut überstehenden Ethanol Rests. Es erfolgte eine Trocknung des Pellets für 5 min bei Raumtemperatur und die anschließende Elution in 30 µl Low TE Puffer. Nach Inkubation am Magnet konnte die aufgereinigte Library entnommen und bei -20°C gelagert werden.

3.3.3.4 Library Konzentrationsbestimmung (Taqman)

Ziel der quantitativen Realtime PCR mittels Taq-Sonden ist die Amplifikation der DNA und die zeitgleiche Messung des DNA-Gehalts. Es werden sowohl Primer als auch genabschnittspezifische Sonden zu der Ausgangs-DNA gegeben. Die Sonden tragen an Ihrem 3' bzw. 5' Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) bzw. einen Quencher, welcher durch das Prinzip des Förster-Resonanz-Energietransfers die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Kommt es bei der Elongation der PCR-Produkte zum Treffen der Taq-Polymerase auf die Sonde, wird diese abgespalten und Reporter und Quencher folglich räumlich

Methoden

voneinander getrennt, sodass die Fluoreszenzwirkung des Reporters nun abhängig von der Anzahl der Elongationsprodukte gemessen werden kann.²⁰

Die quantitative Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels einer Kontrolllibrary aus *E. coli* mit bereits bekannten Konzentrationen. Für die qPCR wurden das Ion Library Taqman Quantitation Kit und MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates verwendet. Die Verdünnung der Standardprobe *E.coli* DH10B erfolgte mit der im Kit enthaltenen Kontrolllibrary (Tabelle 11).

Tabelle 11 *E. coli* DH10B Kontrolllibrary, Verdünnungseinstellung

Standard	Kontrolllibrary	Nuclease-freies Wasser	Verdünnung	Konzentration in pM
1	5 µl (unverdünnt 68 pM)	45 µl	0,1	6,8
2	5 µl Standard 1	45 µl	0,01	0,68
3	5 µl Standard 2	45 µl	0,001	0,068
4	5 µl Standard 3	45 µl	0,0001	0,0068
5	5 µl Standard 4	45 µl	0,00001	0,00068

Es wurden zwei verschiedene Verdünnungen von den jeweiligen Libraries der Proben aus 263.3.3.3 hergestellt (Tabelle 12):

Tabelle 12 Verdünnungen der NGS Library für die Konzentrationsbestimmung

	Volumen Nuclease-freies Wasser	Volumen Library
1:100	198 µl	2 µl
1:1000	90 µl	10 µl

Die Messung aller Standards und der zwei Probenverdünnungen erfolgte in Dreifachbestimmung. Ein Mastermix bestehend aus 10 µl Ion Library TaqMan® qPCR Mix (2x) und 1 µl Ion Library TaqMan® Quantitation Assay (20x) wurde pro Well vorbereitet und auf die PCR Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9 µl der Probe bzw. des Standards unter Mischen durch Auf- und Abpipettieren. Die 96-Well Platte wurde mit einer Klebefolie abgedichtet und kurz

Methoden

abzentrifugiert. Tabelle 13 zeigt den im ViiA™ 7 Realtime PCR System verwendeten Zyklus.

Tabelle 13 qPCR Reaktion

	Temperatur	Zeit
Hold (Polymerase Aktivierung)	95°C	20 sec.
Zyklus (40x)	95°C	1 sec.
	60°C	20 sec.

3.3.4 Emulsions-PCR Ion One Touch 2 (OT2)

Nach der Ligation der Proben an Barcode-Sequenzen und die Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben-Libraries erfolgte nun die Bindung an Mikrospheres. Die Spheres sind Mikrokugeln, welche einerseits einen Einzelstrang des DNA-Amplifikats binden und andererseits später genau in ein Mikro-Well des Sequenzierchips passen. Sie dienen dem Aufbringen der Proben auf den Sequenzierchip. Durch die Emulsions-PCR im OT2 erfolgte die Amplifikation der an Ion Sphere™ Particles gebundenen DNA-Abschnitte. Im Idealfall war ein DNA-Strang mit einer Sphere in den generierten Emulsionstropfen (monoklonal) und wurde mittels PCR amplifiziert, sodass eine Sphere nach der PCR viele monoklonale Kopien des ursprünglichen DNA-Stranges gebunden hat. Nur dann ist später das Sequenzieren des gebundenen Strangs möglich. Binden Stränge polyklonal (zwei oder mehr unterschiedliche DNA-Stränge an eine Sphere), entstehen gemischte Signale beim Sequenzieren, die eine eindeutige Sequenzierung des einzelnen Amplikons verhindern.

Die Emulsions-PCR erfolgte im Ion One Touch 2 System mit dem Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit. Die Initialisierung wurde nach Geräteanweisung durchgeführt. Für die Emulsions-PCR am Ion One Touch 2 wurden 180 pM jeder Library aus 3.3.3.3 eingesetzt. Anhand der Real Time PCR Ergebnisse konnten die einzelnen Libraries entsprechend verdünnt werden.

Eine höhere Effizienz wird beim Next Generation Sequencing durch die Verarbeitung mehrerer unterschiedlicher Proben-Libraries gleichzeitig erreicht. Je 180 pM jeder Library wurden entnommen und zu einem Library-Pool

Methoden

zusammengefügt. Aus diesem Librarypool wurden 2 µl entnommen und in 23 µl Nuklease-freies Wasser gelöst.

Der Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix wurde vor Verarbeitung 30 sec. am Vortex gemischt und zwei sec. zentrifugiert, die Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs wurden eine Minute gemischt und zwei sec. zentrifugiert, der Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix wurde lediglich zwei sec. zentrifugiert. Das Pipettieren der Reagenzien für diese Reaktionen erfolgte an einer sterilen Werkbank.

Zu dem Ion PGM™ Hi-Q™ View Reagent Mix wurden folgende Reagenzien hinzugegeben: 25 µl Nuklease-freies Wasser, 50 µl Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme Mix, 25 µl des verdünnten Library - Pools (s. o.) und 100 µl Ion PGM™ Hi-Q™ View ISPs. Die gesamte Suspension wurde nun gründlich gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einen Ion OneTouch™ Reaction Filter pipettiert. Die Pipettenspitze wurde auf den Sample Port des Filters aufgesetzt und der Reaktionsansatz langsam in den Filter gegeben, ohne erneut zu aspirieren wurde zunächst die Pipettenspitze von der Pipette gelöst und anschließend die Spitze vom Sample Port des Filters entfernt. Insgesamt 1700 µl Reaction Oil wurden in zwei Aliquots zu je 850 µl auf selbe Weise in den Reaction Filter gegeben.

Es wurden zwei Recovery Tubes mit 150 µl Ion PGM™ Hi-Q™ Breaking Solution befüllt und den Geräteanweisungen folgend in das Gerät gestellt. Der Reaction Filter wurde vorsichtig und unter Vermeidung von Durchmischung der zuvor pipettierten Lösungen auf das Gerät gebracht und der Lauf gestartet.

Nach dem Beenden des Laufs wurde die Funktion „Final Spin“ des Gerätes genutzt, um das Reaktionsprodukt als Pellet in den Recovery Tubes weiterverarbeiten zu können. Der Überstand in den beiden Recovery Tubes wurde bis auf 100 µl abgenommen, zu beiden Recovery Tubes wurde 500 µl Ion PGM™ Hi-Q™ Wash-Solution gegeben, vorsichtig gemischt und die Lösungen gemeinsam in ein steriles 1,5 ml DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine zweieinhalbminütige Zentrifugation bei 15.600 x g und die erneute Abnahme des Überstandes bis auf 100 µl. Ein Aliquot von 2 µl wurde für die Qualitätskontrolle (siehe 3.3.6) entnommen und bei 4 °C gelagert.

Methoden

3.3.5 ISP Anreicherung Ion One Touch Enrichment System (OT-ES)

Es folgte eine Anreicherung und eine erneute Aufreinigung des Ion One Touch 2-Produkts am Ion OT-ES. Das OT-ES stellt eine kleine Pipettierroboter-Einheit dar, sodass lediglich die Vorbereitung der Reagenzien und das Befüllen eines 8-Well Strips manuell durchgeführt werden mussten.

Zum Herstellen einer Melt off Solution wurde zunächst eine 1 M NaOH-Lösung hergestellt. Dazu wurden 50 µl einer 10 M NaOH-Lösung mit 450 µl Nuklease freiem Wasser aus dem Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Solutions Kit verdünnt. Nun wurden 280 µl Tween Solution aus selbigem Kit mit 40 µl der angesetzten 1 M NaOH-Lösung gemischt.

Die Ion PGM™ Enrichment Beads wurden 30 sec. gut durchmischt und anschließend zwei sec zentrifugiert. Nach nochmaligem Mischen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden 13 µl der Beads entnommen und in ein 1,5 ml steriles DNA LoBind Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine zweiminütige Inkubation in einem Magnetständer und die Abnahme der überstehenden Flüssigkeit. Zu dem Beadpellet an der Gefäßwand wurden nun 130 µl MyOne Beads Wash Solution gegeben, gut gemischt und anschließend kurz zentrifugiert.

Das erste Well des 8-Well-Strips befindet sich laut Herstellerangaben an dem Ende mit eckigem Plastiküberstand, die Wells wurden wie folgt befüllt:

- Well 1: 100 µl OT-2 Produkt
- Well 2: 130 µl Dynabeads
- Well 3-5: 300 µl Ion One Touch Wash Solution
- Well 6: leer
- Well 7: 300 µl Melt off Solution
- Well 8: leer

Es wurde ein 0,2 ml Non PP Tube mit 10 µl Neutralisierungslösung befüllt und geöffnet in das Gerät gestellt. Der 8-Well Strip wurde mit dem runden Abschluss an den rechten Rand des OT-ES Gerätes platziert, eine Pipettenspitze aus dem Kit auf den Halter gebracht und der Lauf gestartet.

Das Non PP Tube mit dem ES-Produkt wurde nach Beendigung des Vorganges bei 4 °C gelagert. Zuvor wurde ein Aliquot von 10 µl für die Qualitätskontrolle (siehe 3.3.6) entnommen.

Methoden

3.3.6 Qualitätskontrolle: Produkte der Emulsions-PCR und dem Partikel Enrichment

Die Qualitätskontrolle der Produkte des Ion OT2 und des Ion OT- ES erfolgte mit dem Ion Sphere™ Quality control Kit und dem Qubit™ 2.0 Fluorometer. Das Quality control Kit enthält zwei Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor™ 488 und Alexa Fluor™ 647. Alexa Fluor™ 488 bindet an die B Primer bzw. an alle ISPs, Alexa Fluor™ 647 bindet an die A Primer bzw. alle ISPs mit gebundenen Proben (siehe Abbildung 6). Das Verhältnis der Fluoreszenz von AF 488 und AF 647 konnte so eine Aussage über die Qualität der Reaktionsprodukte ermöglichen.

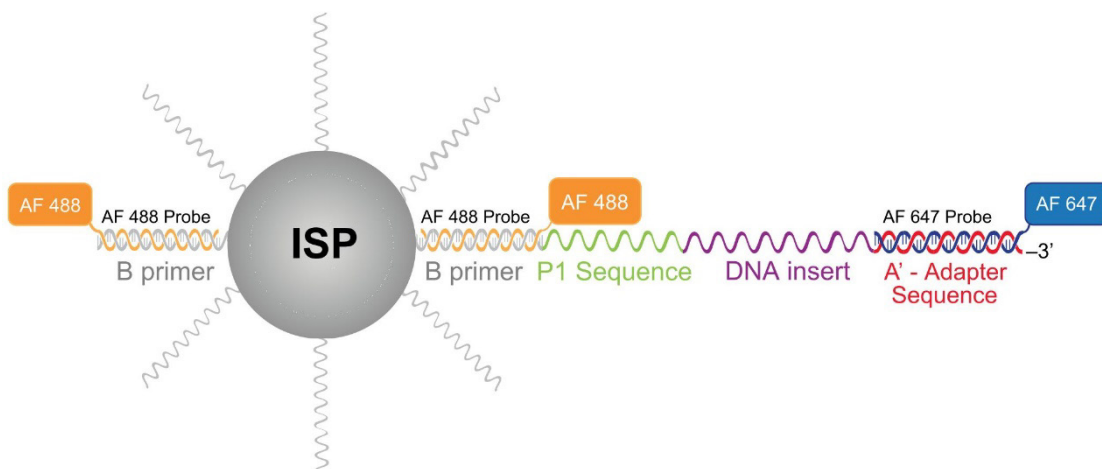


Abbildung 6 An ein ISP gebundene Fluoreszenzstoffe Alexa Fluor™ 488 und Alexa Fluor™ 647 zur fluorometrischen Qualitätskontrolle der Emulsions-PCR (Bindung an die ISP) und des Partikel Enrichment (Reinigung von unbeladenen ISP) - Alexa Fluor™ 488 bindet an alle ISPs, Alexa Fluor™ 647 bindet nur an gebundene Proben, Thermo Fisher Scientific, 16 February 2018 - Ion Sphere Quality Control Kit²¹

Es wurden 2 µl des OT-2-Produkts (siehe Methode 3.3.4) bzw. 10 µl des OT-ES-Produkts (siehe Methode 3.3.5) für diese Kontrolle verwendet. Die zu testenden Proben wurden in Axygen PCT Tubes gegeben und nach Zugabe von 19 µl Annealing Buffer und 1 µl Ion Probe durch auf- und abpipettieren gut gemischt. Anschließend wurde im Thermocycler folgendes Programm durchgeführt: 95°C für 2 min; 37°C für 2 min.

Es folgte die Zugabe von 200 µl Quality Control Wash Buffer und eine Zentrifugation für 2 min bei 15.000 x g. Es schloss sich die Abnahme des Überstandes bis auf 10 µl an. Der gesamte Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden 190 µl Quality Control Wash Buffer zu der Probe gegeben und in ein Qubit Assay Tube überführt. Die

Methoden

vorbereitete Probe, sowie eine Negativkontrolle von 200 µl Quality Control Wash Buffer wurden am Qubit™ 2.0 Fluorometer unter Verwendung der Buttons Ion und AF488 bzw. AF647 gemessen und die Messwerte notiert. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit dem von der Firma Thermo Fisher zur Verfügung gestellten Qubit™ Easy Calculator unter Berücksichtigung des Lot-spezifischen Conversion Faktors, welcher ebenfalls von Thermo Fisher zur Verfügung gestellt wurde.

3.3.7 Sequenzierung-Ion Personal Genome Machine™

Für die Vorbereitung und die Initialisierung der Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) wurde Reinstwasser der Leitfähigkeit 18,2 MΩcm aus der Elga Reinstwasseranlage entnommen. Vor Initialisierung der PGM™ musste wöchentlich eine Spülung mit einer Chlorid-Lösung durchgeführt werden, diese wurde mit dem Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit hergestellt. Es wurde eine 1 M NaOH-Lösung bestehend aus 900 µl Reinstwasser und 100 µl 10 M NaOH-Lösung vorbereitet. Eine Glasflasche wurde mit Reinstwasser gespült und 1 l Reinstwasser befüllt. Nach der Zugabe einer Chlorid Tablette aus dem Kit und 1 ml der vorbereiteten 1 M NaOH-Lösung erfolgte eine mindestens 10-minütige Inkubation. Die Chloridlösung wurde nun mittels eines 0,22 µm Vakuumfiltersystems steril filtriert und konnte für den Waschvorgang an der PGM verwendet werden. Nach dem Chlorid-Wash erfolgte eine doppelte Spülung mit Reinstwasser. Vor jedem Sequenzier-Lauf wurde eine Initialisierung des Gerätes durchgeführt.

3.3.7.1 Initialisierung

Für die Initialisierung wurde aus Reinstwasser und einer 10 M NaOH-Lösung einer 100 mM NaOH-Lösung frisch hergestellt (Tabelle 14).

Tabelle 14 Herstellung einer 100 mM NaOH - Lösung

	Reinstwasser	NaOH-Lösung
1 M NaOH-Lösung	450 µl	50 µl (10 M NaOH -Lösung)
100 mM NaOH-Lösung	450 µl	50 µl (1 M NaOH-Lösung)

Methoden

Die Waschflaschen W1 – W3 wurden dreifach mit Reinstwasser aus der Elga-Anlage gespült, die Flaschen W1 und W3 mit jeweils 50 ml und die Flasche W2 mit 200 ml. Die W1 Flasche wurde mit 350 µl 100 mM NaOH-Lösung befüllt. Die W3 Flasche wurde mit 50 ml der W3 Lösung aus dem Ion PGM™ Wash 2 Bottle Kit befüllt. Die Flasche W2 wurde zunächst für mindestens 10 min mit Stickstoff begast und anschließend mit 2 l Reinstwasser befüllt, außerdem wurden 50 µl 100 mM NaOH-Lösung, sowie eine Flasche der W2 Solution aus dem Kit hinzugefügt.

Für die weitere Initialisierung wurde den Geräteangaben Folge geleistet. Es erfolgte ein Lineclear und die Auto-pH-Einstellung der W2 Flasche.

Die dNTPs wurden aufgetaut und je 20 µl in die entsprechenden Tubes pipettiert und an das Gerät angebracht. Dafür wurden für jede Nukleinsäure ein neues Paar Handschuhe verwendet. Der zweite Teil der Initialisierung am Gerät wurde gestartet und nach Abschluss die einzelnen pH-Werte der Lösungen zu Kontrolle notiert.

3.3.7.2 Erstellung des Run Plans

Vor Sequenzierung wurde ein Run Plan auf der Ion Torrent Server Plattform erstellt. Der Run Plan ist ein elektronisches Protokoll und enthält alle Programmschritte, die für einen Sequenzierungslauf erforderlich sind. Es wurden die Reagenzien, die Humane Genomreferenz Version 19 (hg19/Genome Reference Consortium Human Build 37-GRCh37), sowie Plugins zur Datenanalyse und Datenverwaltung ausgewählt. Festgelegt wurden für jeden Run die Hotspot Regionen im „MPNnew.hotspot.bed“ File und die Target Regionen im „WG_IAD97930_2poolredund.20170411.designed.bed“ File.

Für die Zuordnung der Proben zu den mit Barcodes versehenen Rohdaten wurden die Probennamen in Verbindung mit den entsprechenden Barcodes im Run Plan eingegeben.

3.3.7.3 Chipbeladung

Die Vorbereitung der Probe erfolgte unmittelbar vor dem Beginn der Sequenzierung und mit dem Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit.

Methoden

Es wurden die Ion 316™ Chip Kit und Ion 318™ Chip Kit zur Sequenzierung verwendet. Zu der Probe aus dem OT-ES (siehe 3.3.5) wurden 5 µl Testfragmente (control ISPs) gegeben, gut gemischt und anschließend für 2 min bei 15.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 15 µl entnommen und 12 µl Sequenzierprimer hinzugegeben. Es erfolgte das Primerannealing bei 95°C für 2 min und 37°C für 2 min. Nach dem Primerannealing und dem Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 3 µl Polymerase. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.

Vor der Beladung des Chips mit der Probe wurde die Funktionalität des eigentlichen Sequenzier-Chips über einen sog. „Chip check“ an der PGM durchgeführt. Dafür wurde der Chip von der Sequenziermaschine mit Spülpuffer benetzt, dieser musste anschließend vollständig entfernt werden. Die Flüssigkeit wurde mit einer Pipette an der Probenöffnung entnommen werden, anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 sec. in der Ion Chip™ Minifuge. Der Chip war dabei umgedreht im Bucket und der Chip Tab war nach innen gerichtet. Abbildung 7 zeigt die Ion Chip™ mit Chip Bucket und Ion 318™ Chip.

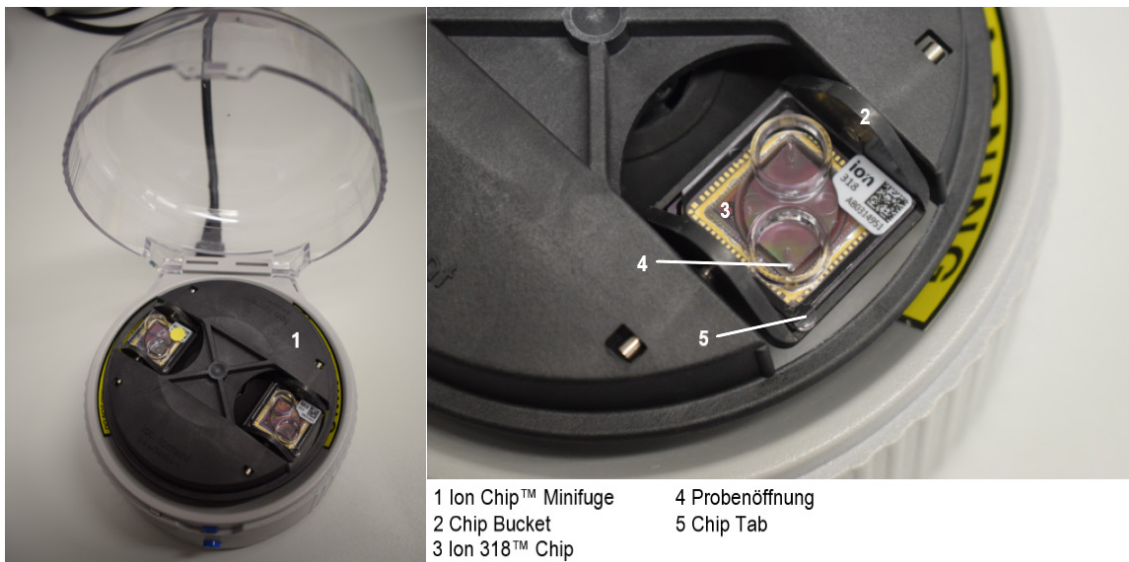


Abbildung 7 Ion Chip™ Minifuge mit Ion 318™ Chip im Chip Bucket und Chip Tab nach außen

Betrag das Volumen der Probe für die Beladung des Chips weniger als 30 µl wurde diese mit Annealing Buffer bis zu einem Ladevolumen von 30 µl aufgefüllt. Die Probe wurde mit einer Rainin Pipette aufgenommen und in die Probenöffnung des Chips pipettiert. Dazu wurde das Aufnahmevolumen der Pipette durch

Methoden

Drehen des Volumenreglers langsam bis auf 0,5 µl verringert. Es erfolgte eine Zentrifugation des Chips im Chip Bucket der Ion Chip™ Minifuge: zunächst mit dem Chip Tab nach innen für 30 sec., anschließend mit dem Chip Tab nach außen für 30 sec. Im 45° Winkel im Bucket gehalten, wurden jeweils 25 µl bzw. 5 µl der Probe langsam aus dem Chip pipettiert und anschließend zurück auf den Chip beladen, um eine mehrfache Überströmung der Mikrowells durch die Probe zu ermöglichen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Gesamte Volumen wurde vorsichtig aus dem Chip entfernt, verbleibende Flüssigkeitsreste konnten mit Hilfe einer Zentrifugation entfernt werden: Chip umgekehrt im Bucket und Chip Tab nach innen für 5 sec., die restliche Flüssigkeit von der Probenöffnung wurde entfernt. Der Chip wurde in die Ion Personal Genome Machine™ eingespannt und der Geräteanweisung folgend der Run gestartet.

3.3.8 Auswertung der NGS Daten

Die beim Run entstehenden Rohdaten (Reads) wurden während des Sequenzier-Laufs auf dem Torrent Server gespeichert und durch die systemeigene Software Torrent Suite™ (Version 5.10.0) zu Unmapped BAM-Files sortiert. Den Zugriff auf die generierten Daten wurde durch den Torrent Browser gewährleistet. Der Torrent Browser ermöglicht dem Endnutzer Zugriff auf die generierten Daten indem BAM Files zusammengefasst wurden. Mithilfe von Software Plugins und dem von Thermo Fisher Scientific zur Verfügung gestellten Onlinetool Ion Reporter™ (Version 5.10.5.0) standen die Daten zur Auswertung zur Verfügung.

Ein automatisch erstellter Runreport ermöglichte die erste Übersicht zur Proben- und Datenqualität des jeweiligen Laufs. Hier wurde u.a. die Beladung des Chips (zur Auswertung mindestens 60 %) und das Vorhandensein Polyklonaler Spheres (zur Auswertung des Ergebnisses < 25 %) beurteilt.

Eine Coverage Analyse wurde durch die Ion Reporter™ Software angezeigt und war in Form einer Excel-Datei verfügbar. Als minimale Abdeckung eines zu beurteilenden Amplikons zur Detektion von somatischen Mutationen wurden mindestens 500 Reads definiert.

Die Visualisierung detektierter genetischer Varianten erfolgte mittels eines Variant Callers (Version 5.10.0.18) Plug-Ins ebenfalls auf der Torrent Suite™

Methoden

Plattform und als .vcfgz Datei. Hier wurden genetische Varianten durch die Software erkannt und mit der Allelfrequenz angegeben. Die Einstellungen der Software begrenzen in der Standardkonfiguration das ausgegebene Ergebnis auf 2000 ausgewertete Reads pro Amplikon und eine minimale Allelfrequenz von 2 %. Die Richtigkeit der von den Software-Plug-Ins angezeigten Ergebnisse wurden mit Hilfe des Java-basierten Integrative Genomics Viewer (IGV, Version 5.01) der die Darstellung der Rohdaten ermöglicht, kontrolliert. Allelfrequenzen < 2 % konnten in den Rohdaten durch Nachvollziehen aller Reads des interessanten Genabschnitts identifiziert werden. Um eine detektierte Aberration von zufälligen Sequenzierfehlern zu unterscheiden wurde ein Minimum von zehn sequenzierten veränderten Basen vorausgesetzt.

3.4 Prävalenzstudie

Die Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ wurde 2016 konzipiert und seit dem 26.04.2016 durch die Gesellschaft der Internisten in Mecklenburg-Vorpommern gefördert. Vom 22.02.2017 bis zum 20.02.2019 wurde die Probenakquise im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit lag ein gültiges Ethikvotum der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vor (A 2016-0200 vom 22.11.2016).

3.4.1 Probenakquise

Die Akquise von Proben der Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ in Mecklenburg-Vorpommern war von einsendenden Ärzten abhängig. Zu Beginn der Studie wurde Informationsmaterial in Form eines Anschreibens an ärztliche Kollegen versendet. Es wurde um eine, mit dem Antikoagulans EDTA versetzte, periphere Blutprobe von Patienten mit aktueller oder stattgehabter abdominaler Venenthrombose gebeten. Dem Anschreiben waren eine Informationsbroschüre in Form eines Flyers, je ein Informationsschreiben mit einer Formulierung für den Arzt und den Patienten, ein Vordruck zur Einverständniserklärung des Patienten, welcher die Option beinhaltet, einer Befundübermittlung an den behandelnden

Methoden

Arzt zuzustimmen, sowie ein klinischer Fragebogen beigelegt. Die erwähnten Dokumente sind im Anhang (9.1; 9.2; 9.3; 9.5) zu finden. Der Versand erfolgte an alle Kliniken für Innere Medizin und Chirurgie, fernerhin an alle niedergelassenen Fachärzte für Hämatologie, Onkologie und Gastroenterologie im Bundesland Mecklenburg-Vorpommern. Die Adressabfrage erfolgte durch Verwendung der Webseiten des deutschen Krankenhausverzeichnisses (<http://www.deutsches-krankenhaus-verzeichnis.de>, Zugriff zuletzt am 21.10.2021) und der Kassenärztlichen Vereinigung Mecklenburg-Vorpommern (<http://www.kvmv.info/index.html>, Zugriff zuletzt am 21.10.2021). Insgesamt wurden ab dem 24.03.2017 27 Kliniken für Innere Medizin, 28 Kliniken für Chirurgie und 17 niedergelassene Fachärzte für Onkologie und Hämatologie per Anschreiben über das Studienvorhaben informiert und um Probeneinsendung gebeten. Ab dem 16.10.2017 wurden zusätzlich 20 niedergelassene Fachärzte für Gastroenterologie in Mecklenburg-Vorpommern angeschrieben. Der Versand konnte via Standard Postversand erfolgen. Die angegebene Einsendeadresse lautete: Hämatologisches Speziallabor, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock, Ernst-Heydemann-Straße 6, 18055 Rostock.

Für den Einschluss in die Studie mussten folgende Kriterien erfüllt sein:

- Die eingesendete Probe entstammt von einem Patienten mit aktueller oder stattgehabter abdominalen Venenthrombose.
- Es liegt zu der Probe eine gültige Patienteneinverständniserklärung vor.
- Der klinische Fragebogen, ausgefüllt vom einsendenden Arzt, ist vorhanden.

3.4.2 Probeneingang

Die Bearbeitung der Proben fand im Hämatologischen Speziallabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock statt. Die DNA in EDTA versetztem Blut ist für einige Tage bei Raumtemperatur stabil, sodass die Proben per Standardversand eingesendet werden konnten.

Bei Ankunft der Proben (mindestens 5 ml peripherem Blut in EDTA-Röhrchen) wurde zunächst das Vorhandensein einer gültigen

Methoden

Patienteneinverständniserklärung geprüft. Die Proben wurden pseudonymisiert bearbeitet. Zur Pseudonymisierung erfolgte eine fortlaufende Vergabe von Probennummern beginnend mit MPN1.

Die Anfertigung von Blutausstrichen erfolgte sofort nach Probeneingang. Nach maximal 48 h und Lagerung bei 4 °C erfolgte die weitere Verarbeitung der Probe für die molekularbiologische Untersuchung (3.2).

3.4.2.1 Datenbank für Studienpatienten

Die von den ärztlichen Einsendern auf den klinischen Fragebögen angegebenen klinischen Informationen wurden in eine Datenbank übertragen. Die Datenbank wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 erstellt und geführt.

Erfasst wurden:

- Probanddaten
 - Datum der Blutentnahme
 - Eingangsdatum
 - Vorhandene Einverständniserklärung des Patienten
 - Einsender / einsendende Station
 - Einwilligung zur Befundübermittlung
 - Befunddatum
- Patientendaten
 - Initialen
 - Geschlecht
 - Geburtsdatum
 - Patientenalter bei Probenentnahme
- Probenbearbeitung
 - Datum der DNA-Isolation
 - Run-Nummer
 - verwendetes Panel
 - Mutationsstatus der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* mit Allelfrequenz
- Klinische Angaben
 - klinische Beschwerden des Patienten

Methoden

- Vorhandensein einer abdominalen Venenthrombose
 - Pfortader
 - Lebervenen
 - Milzvenen
 - Mesenterialvenen
 - andere Venen
- bildgebende Diagnostik
- Datum der Diagnose
- durchgeführte Therapie
 - verwendetes Antikoagulans
 - Operation
- Status einer Hepatomegalie und / oder Splenomegalie
- Leberzirrhose
- vorausgegangene Thromboembolie
- bekannte Thrombophilie
 - Genese
- Tumorerkrankung
 - Tumorart
- Blutparameter
 - Leukozytenzahl
 - Hämoglobin
 - Thrombozytenzahl
 - LDH

3.4.3 Herstellung von Blutaussstrichen

Zur zytomorphologischen Beurteilung des Patientenbluts und der Erstellung eines manuellen Differentiablutbildes wurden Blutaussstriche nach der Standard Operating Procedure (SOP) des hämatologischen Speziallabors wie folgt angefertigt.

Für die Herstellung von Blutaussstrichen wurde ein Tropfen EDTA-Blut der Patientenprobe auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig ausgestrichen. Von jeder Patientenprobe wurden vier Blutaussstriche angefertigt.

Methoden

Nach dem Trocknen der Blutausstriche für mindestens 1 h standen diese zur Färbung zur Verfügung. Jeweils zwei der vier Blutausstriche wurden nach Pappenheim angefärbt. Die Pappenheim-Färbung kombiniert die Färbungen nach May-Grünwald und Giemsa und beruht auf dem Prinzip einer Neutralisation der Zellbestandteile. Saure Zellbestandteile werden durch die Reaktion mit basischen Farbstoffen angefärbt, die basischen Zellbestandteile entsprechend mit sauren Farbstoffen. Die Durchführung der Pappenheim-Färbung erfolgte nach der SOP des Hämatologischen Speziallabors der Klinik für Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin, Zentrum für Innere Medizin der Universitätsmedizin Rostock. Es erfolgte das wöchentliche Ansetzen eines Färbepuffers mit einem pH-Wert von 6,88. Dazu wurde der Färbepuffer in einem Verhältnis von 1,5:10 mit Aqua dest. verdünnt. Aus 60 ml des Färbepuffers und 15 ml Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau der Firma Merck wurde täglich eine Giemsa-Lösung hergestellt. Die May-Grünwald-Lösung wurde vor Verwendung durch einen Filter gegeben.

Zur Färbung der Blutausstriche erfolgte eine 6-minütige Inkubation in May-Grünwald-Lösung. Die Blutausstriche wurden in Färbepuffer gewaschen und anschließend in Giemsa-Lösung für 20 min inkubiert. Die Ausstriche wurden erneut in Färbepuffer gewaschen, für 2 min in Färbepuffer inkubiert und mit Aqua dest. gespült bis die überschüssige Farbe entfernt war. Die Blutausstriche wurden in Schräglagerung getrocknet und standen dann zur mikroskopischen Beurteilung zur Verfügung.

3.4.4 Zytomorphologische Beurteilung der Blutausstriche

Vor der Beurteilung der Blutausstriche unter dem Mikroskop wurde ein makroskopischer Eindruck zum Präparat vermerkt. Es wurde mit den Mikroskopen Nikon Eclipse E400 und E600 mit Okular zur 10-fachen Vergrößerung gearbeitet. Die Präparate wurden mit Hilfe verschiedener Vergrößerungsobjektive (10 x, 20 x, 40 x, 50 x, 100 x) begutachtet. Nach dem Auftragen eines Tropfens Immersionsöl konnte das Präparat mit den Objektiven mit 500- und 1000-facher Vergrößerung näher beurteilt werden.

Die nach Pappenheim gefärbten Blutausstriche wurden auf typische morphologische Merkmale des Blutbildes bei MPN, untersucht. Durch die

Methoden

Anfertigung eines Differentialblutbildes wurden die quantitativen Angaben zum Blutbild (Leukozytenzahl, Hämoglobin und Thrombozytenzahl) aus den klinischen Fragebögen durch eine qualitative Auswertung ergänzt. Fernerhin erfolgte die Darstellung einer möglichen Linksverschiebung, sowie morphologischen Veränderungen der Leukozyten. Für die Leukozytendifferenzierung wurden 100 Leukozyten beurteilt und ausgezählt.

Des Weiteren wurde die Morphologie der Erythrozyten unter den Gesichtspunkten typischer erythrozytärer Veränderungen bei MPN (Anisozytose, Tränentropfenformen, basophile Tüpfelungen, erythrozytäre Vorläuferzellen) untersucht.

Typische Veränderungen der Thrombozyten bei MPN (Riesenthrombozyten, Thrombozytenaggregate) wurden ebenfalls erfasst.

Ein zusammenfassender zytomorphologischer Befund wurde für jede Probe angefertigt (Anhang: 9.6).

3.4.5 Befunde und Patientenbindung

Hatte der Studienpatient seine Einwilligung zur Ergebnismitteilung an den behandelnden Arzt gegeben, wurde der Befund dem einsendenden Arzt zugeschickt (Anhang: 9.7). Den Kollegen wurde eine Vorstellung des Patienten zur Befundbesprechung der Analyseergebnisse im Rahmen der Studie durch die Studienärzte angeboten. Bei Nachweis einer Mutation wurde eine Vorstellung empfohlen.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung des NGS Panels

Die Panelvalidierung hatte das Ziel, die Sensitivität der verwendeten Methode des NGS zu evaluieren.

Es handelte sich um ein NGS Panel, bestehend aus zwei Pools mit insgesamt 82 Primerpaaren. Die durch dieses Panel bei PCR generierten Amplikons deckten überlappend die gesamte proteinkodierende Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* ab.

Mit Hilfe von DNA mit nachgewiesenen Mutationen und bekannten Allelfrequenzen wurden DNA-Verdünnungsreihen hergestellt (3.3.2) und die Sensitivität der Sequenzier-Methode bestimmt. Das Ziel war eine Validierung der Methode sowie die Evaluation der Sensitivität im Bereich geringer Allelfrequenzen.

Es wurde eine Minimalabdeckung von 500 Reads pro Base angestrebt.

4.1.1 Allelfrequenz der Mutation *JAK2* p.V617F - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen

In der verwendeten DNA lag die Mutation *JAK2* p.V617F vor. Die Verdünnung der Allelfrequenz wurde wie in 3.3.2 durchgeführt, sodass DNA mit theoretischen Allelfrequenzen von 50 %, 25 %, 12,5 %, 5 %, und 1 % vorlag. Bei der experimentellen Bestimmung konnte bei allen Verdünnungsstufen eine minimale Abdeckung von 500 Reads erreicht werden. Abbildung 8 zeigt die detektierten Allelfrequenzen der Verdünnungsreihe für diese Verdünnungen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den theoretisch ermittelten Allelfrequenzen der Tumor-DNA Verdünnung der Mutation *JAK2* p.V617F und der experimentell bestimmten Allelfrequenzen beträgt $r = 1.00$ ($p < 0.05$).

Ergebnisse

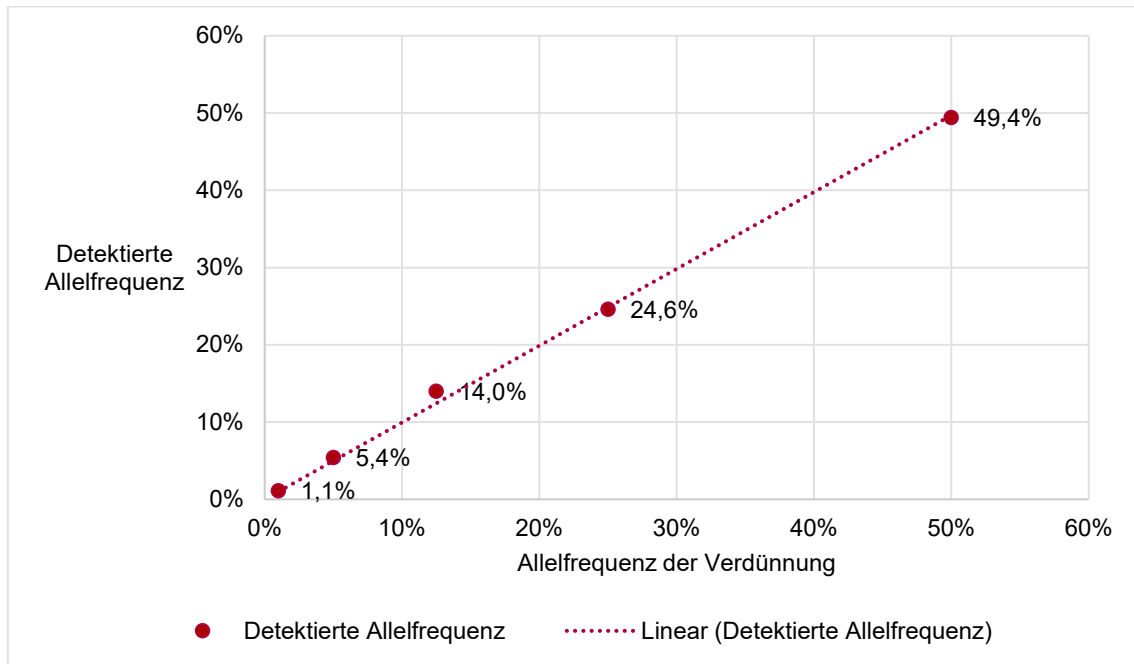


Abbildung 8 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz für *JAK2* p.V617F

Die Probe mit der errechneten Allelfrequenz der Mutation *JAK2* p.V617F von 1 % konnte im Experiment mit einer Allelfrequenz von 1,1 % detektiert werden. Wie in Abbildung 9 zu erkennen, wurden bei einer Gesamtabdeckung von 4184 Reads in 4130 Reads die Base Guanin sequenziert, 52 Reads der Base Thymin stellen die Mutation in der Probe dar.

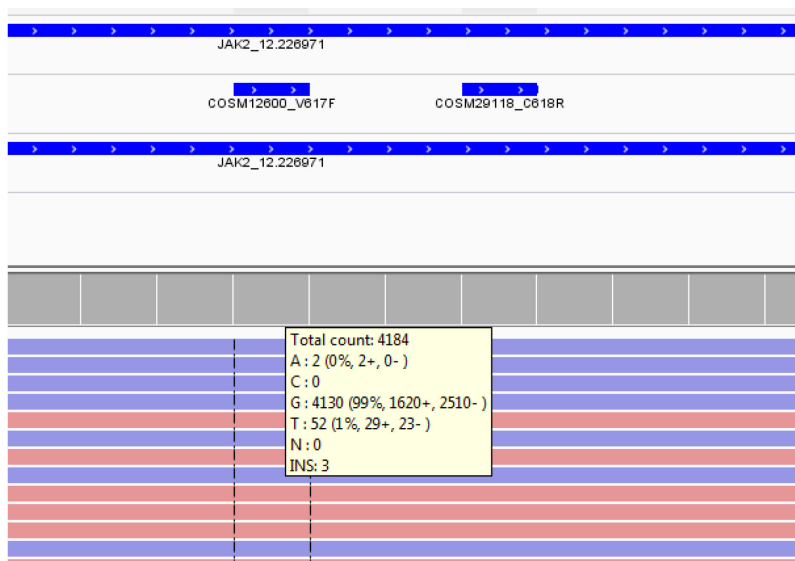


Abbildung 9 Ausschnitt IGV Browser, Abdeckung der 1 % Allelfrequenz-Verdünnung von *JAK2* p.V617F

Ergebnisse

4.1.2 Allelfrequenz der Mutation *MPL* p.W515L - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen

In der verwendeten DNA-Verdünnungsreihe lag die Mutation *MPL* p.W515L theoretisch zu 50 %, 25 %, 12,5 %, 5 % und 1 % vor. Im Experiment konnten für alle Verdünnungen die 500 Reads Minimalabdeckung erreicht werden. Abbildung 10 zeigt die detektierten Allelfrequenzen der Verdünnungsreihe für diese Verdünnungen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den theoretisch ermittelten Allelfrequenzen der Tumor-DNA Verdünnung der Mutation *MPL* p.W515L und der experimentell bestimmten Allelfrequenzen beträgt $r = .99$ ($p < 0.05$).

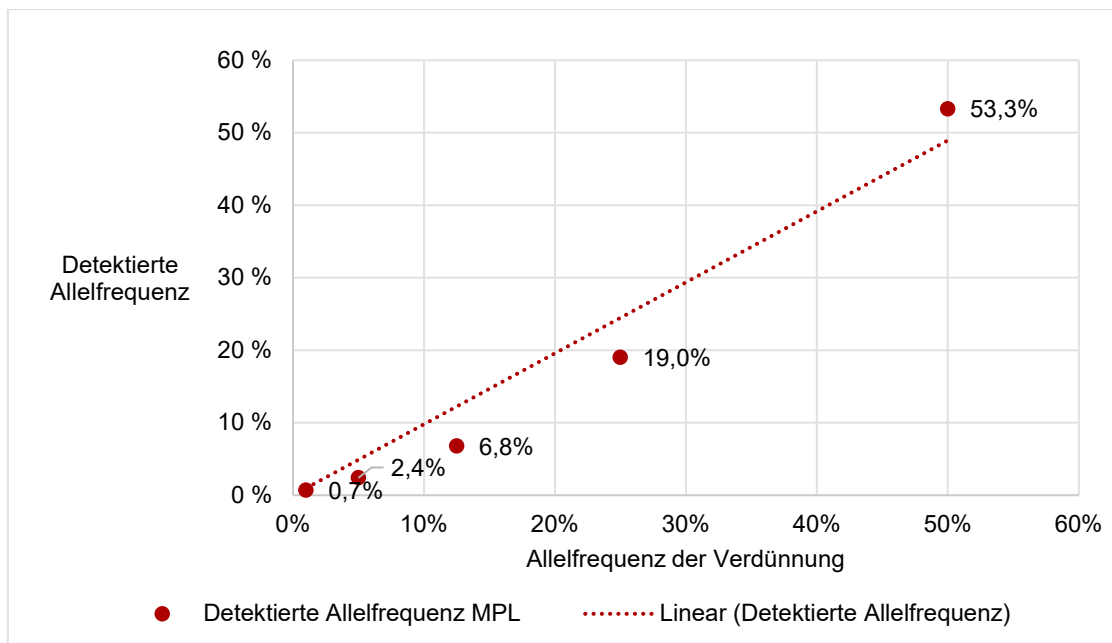


Abbildung 10 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz *MPL* p.W515L

Die Probe mit der errechneten Allelfrequenz der Mutation *MPL* p.W515L von 1 % konnte im Experiment mit einer Allelfrequenz von 0,7 % detektiert werden. Wie in Abbildung 11 zu erkennen, wurden bei einer Gesamtabdeckung von 2723 Reads in 2706 Reads die Base Guanin sequenziert, 16 Reads der Base Thymin stellen die Mutation in der Probe dar.

Ergebnisse

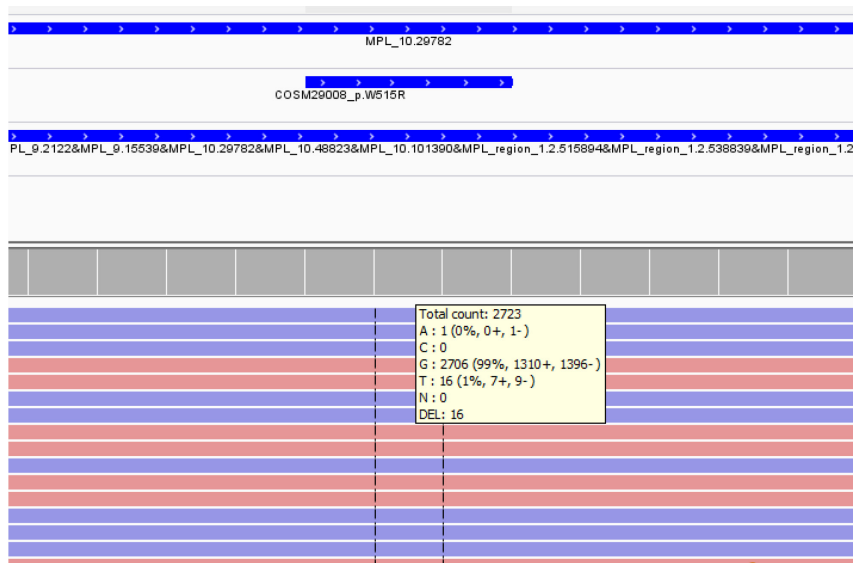


Abbildung 11 Ausschnitt IGV Browser, Abdeckung der 1 % Allelfrequenz-Verdünnung von *MPL* p.W515L

4.1.3 Allelfrequenz der Mutation *CALR* Mutation Typ 1 - Korrelation der errechneten versus der experimentell bestimmten Allelfrequenzen

In der verwendeten DNA-Verdünnungsreihe lag die Mutation Typ 1 des Gens *CALR* theoretisch zu 25 %, 12,5 %, 5 %, und 1 % vor. Die Minimalabdeckung von 500 Reads pro Base wurde hier für alle Verdünnungen erreicht. Abbildung 12 zeigt die detektierten Allelfrequenzen der Verdünnungsreihe für diese Verdünnungen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den theoretisch ermittelten Allelfrequenzen der Tumor-DNA Verdünnung der Mutation *CALR* Mutation Typ 1 und der experimentell bestimmten Allelfrequenzen beträgt $r = .99$ ($p < 0.05$).

Ergebnisse

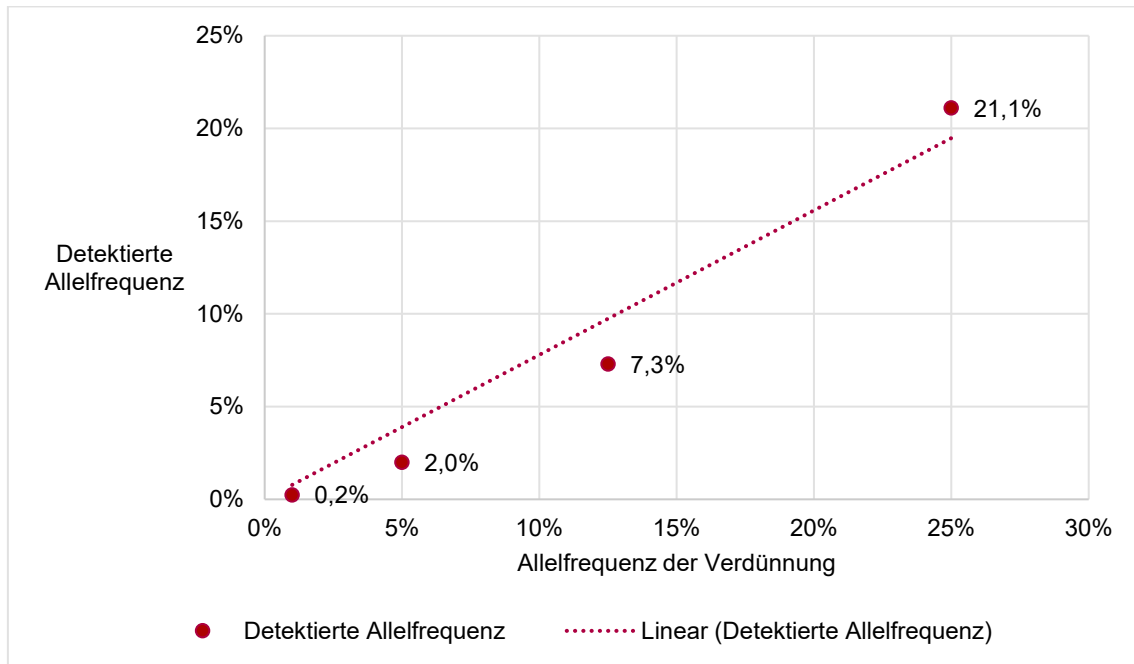


Abbildung 12 Allelfrequenz der Verdünnung versus detektierte Allelfrequenz *CALR* Mutation Typ 1

Die Probe mit der errechneten Allelfrequenz der Mutation *CALR* Mutation Typ 1 von 5 % konnte im Experiment mit einer Allelfrequenz von 2,0 % detektiert werden. Wie in Abbildung 12 zu erkennen wurde die *CALR* Mutation Typ 1 Deletion, bei einer Gesamtabdeckung von 5485 Reads, 107-fach sequenziert. Die Detektion der Verdünnung mit theoretisch 1 % mutierter DNA konnte hier nicht mit ausreichender Sicherheit detektiert werden, sodass für die Detektion von *CALR* Mutationen eine geringere Sensitivität erreicht werden konnte als für die Mutationen der Gene *JAK2* und *MPL*.

Ergebnisse



Abbildung 13 Ausschnitte IGV Browser, Abdeckung der 5 % Allelfrequenz-Verdünnung von CALR Mutation Typ 1

4.2 Anwendung des NGS Panels im Rahmen der Studie

Im Zeitraum Februar 2017 bis Februar 2019 sind 45 Proben im Rahmen der Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ eingegangen. Eine der Proben blieb ohne gültige Einverständniserklärung, eine weitere Probe wurde als zweimalige Einsendung vom gleichen Patienten identifiziert, es wurde nur die erste Probe berücksichtigt. Insgesamt beziehen sich folgende Angaben auf 43 Proben.

4.2.1 Erythrozytenlyse, DNA-Isolation und Sequenzierung

Die wie in 3.2 beschriebene Erythrozytenlyse erbrachte bei allen 43 Patientenproben mindestens ein Zellpellet (überwiegend zwei Zellpellets) mit 10 Millionen Zellen, welches zur DNA-Isolation geeignet war. Die DNA-Isolation erfolgte wie in 3.2 beschrieben mit dem Kit NucleoSpin® Tissue der Firma Macherey und Nagel. Das Ergebnis war der Erhalt von in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluierte DNA der Patientenprobe. In jedem Fall waren in der so gewonnenen Probe DNA enthalten. Die Konzentrationen der DNA lagen bei mindestens 120 ng/µl. Die für die anschließende Sequenzierung benötigten 10 ng DNA waren somit durchgehend enthalten.

Ergebnisse

Die 43 Patientenproben wurden auf Mutationen der proteinkodierenden Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* untersucht. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht aller Proben und die in Hotspot Regionen der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* aufgefundenen Mutationen. Die Allelfrequenz der Mutation ist in Prozent angegeben. Insgesamt konnten dreizehn Veränderungen der Hotspot Nukleotidpositionen nachgewiesen werden. Dabei wurden sechs Mutationen unterhalb der allgemein beschriebenen Nachweisgrenze von 2 % Allelfrequenz identifiziert. In Tabelle 15 sind diese Angaben eingeklammert dargestellt.

Bei der Auswertung der Sequenzierdaten wurde auf eine ausreichende Sequenziertiefe von mindestens 500 Reads aller Basen geachtet.

4.2.1.1 Prävalenz von *JAK2* Mutationen

Die Prävalenz von *JAK2*-Mutationen als Ergebnis der Studie „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei abdominalen Venenthrombosen in Mecklenburg-Vorpommern“ beträgt bei 7 von 43 *JAK2* positiven Ergebnissen in der untersuchten Studienkohorte durch Sequenzierung mittels NGS 16,3 %. Zudem konnten vier Proben mit einer Allelfrequenz unter 2 % (0,2%; 0,6 %; 1,4 %; 0,3 %) für die *JAK2*-Mutation beschrieben werden. Die Mutationen im *JAK2* Gen sind allesamt als Mutation p.V617F detektiert worden.

4.2.1.2 Prävalenz *MPL* und *CALR* Mutationen

Neben dem *JAK2* Gen wurde bei den 43 eingesendeten Proben auch das Gen *MPL* auf Mutationen untersucht. Hier fand sich unter den 43 eingesendeten Proben keine eindeutig über dem Cut off einer Allelfrequenz von 2 % liegende Mutation. Lediglich zwei unter dem Cut off liegende Ereignisse (1,2 %; 0,5 %) konnten detektiert werden. Die zwei aufgetretenen Mutationen zeigten sich als *MPL* p.W515R Mutationen.

Unter den 40 untersuchten Proben konnte keine *CALR* Mutation detektiert werden.

Ergebnisse

Tabelle 15 Allelfrequenzen detektierter Hotspot Mutationen, Mutationen mit Allelfrequenzen unter dem allgemein angenommenen Cut off von 2 % sind eingeklammert, *Bei diesen Proben wurde nicht das beschriebene NGS Panel verwendet eine Aussage zu den markierten Mutationen ist daher nicht möglich

	JAK2				MPL								CALR	
	p.L611V	p.V617F	p.C618R	p.D620E	p.S505N	p.A506T	p.W515K	p.W515R	p.W515A	p.W515S	p.W515L	p.A519T	Typ 1	Typ 2
MPN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k.A.*	k.A.*
MPN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k.A.*	k.A.*
MPN4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k.A.*	k.A.*
MPN5														
bis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN10														
MPN11	-	13,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN12														
bis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN17														
MPN18	-	31,4 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN19														
bis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN27														
MPN28	-	(0,2 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN30	-	24,6 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN33	-	-	-	-	-	-	-	(1,2 %)	-	-	-	-	-	-
MPN34	-	(0,6 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN36	-	(1,4 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN38	-	43,0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN42	-	16,8 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN43	-	28,2 %	-	-	-	-	-	(0,2 %)	-	-	-	-	-	-
MPN44	-	13,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MPN45	-	(0,3 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ergebnisse

4.2.2 Herkunft und Fachrichtung der einsendenden Ärzte

Die 43 Patientenproben wurden aus verschiedenen Orten Mecklenburg-Vorpommerns zur Berücksichtigung in der Studie eingesendet.

Es erfolgte eine Zusendung von 32 Proben aus Rostock (74 %), 4 Proben aus Ribnitz-Damgarten (9 %), zwei Proben aus Stralsund (5 %) sowie Greifswald (5 %) und je eine Probe aus Wismar (2 %), Waren (2 %) und Neubrandenburg (2 %) (Abbildung 14).

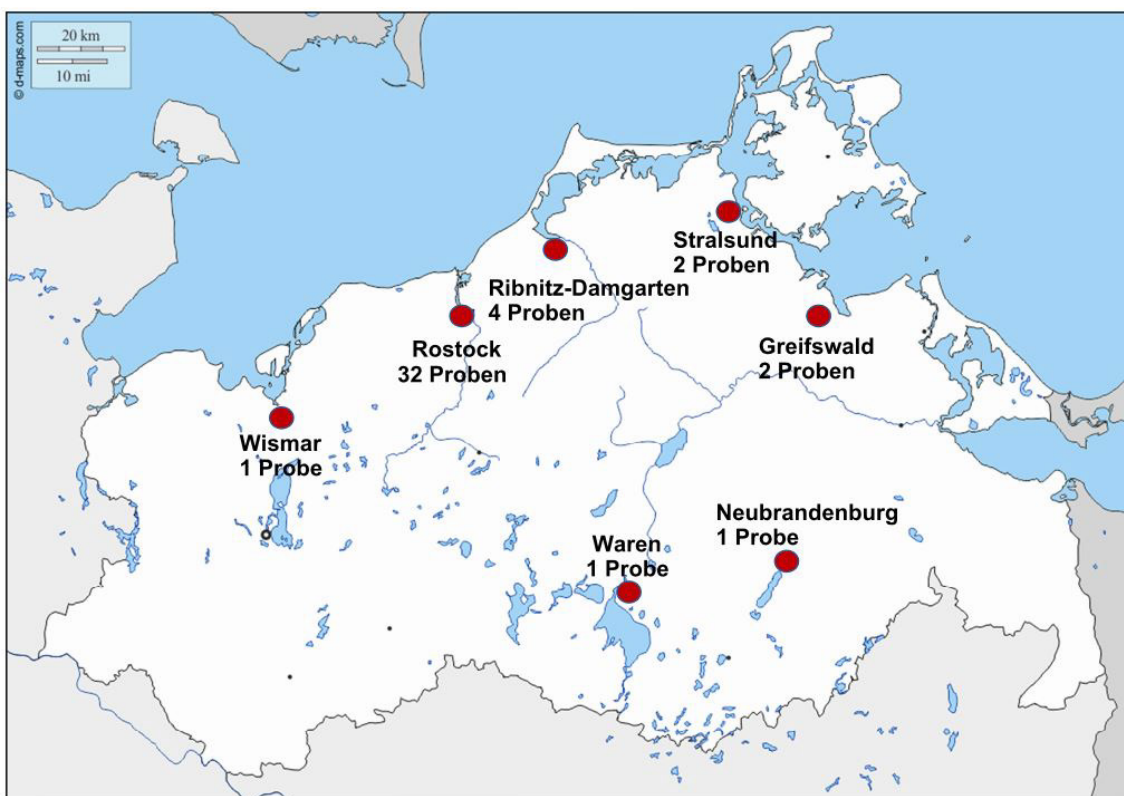


Abbildung 14 Herkunft der Proben, n=43, Karte modifiziert nach d-maps.com

Die Einsendungen kamen überwiegend von Klinikärzten, nur drei Proben wurden von niedergelassenen Ärzten eingesendet.

Unter den Einsendungen fanden sich Proben aus sechs verschiedenen medizinischen Fachgebieten, darunter Hämatologie/Onkologie, Gastroenterologie, Chirurgie, Nephrologie, Anästhesiologie und Dermatologie (Abbildung 15).

Ergebnisse

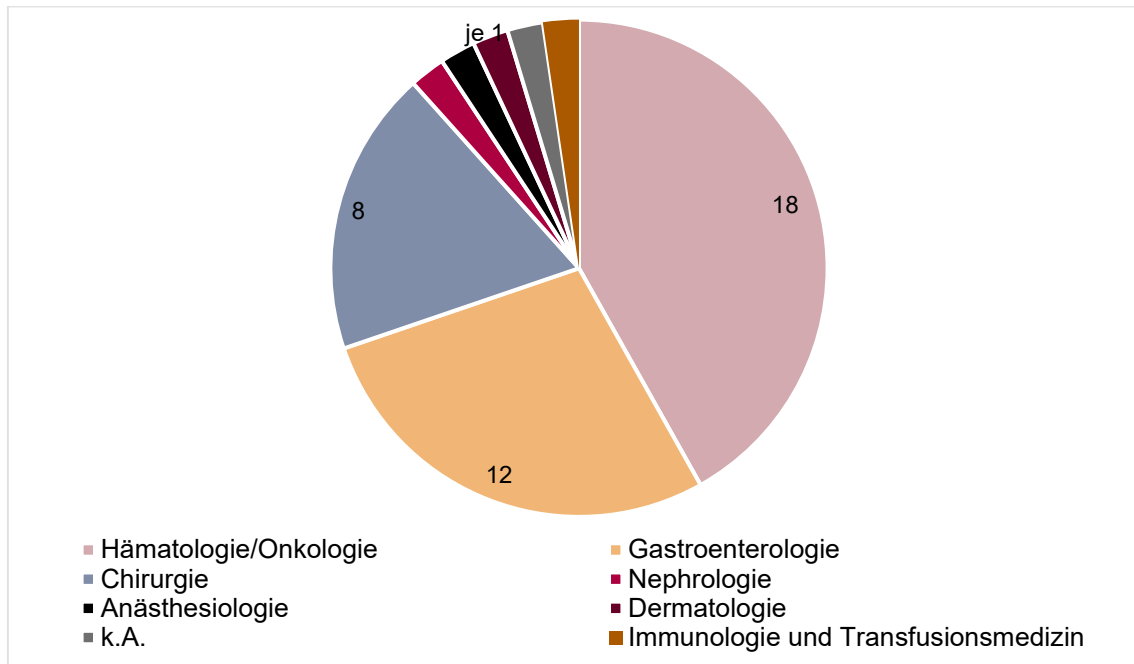


Abbildung 15 Verteilung der Probeneinsendungen in Bezug auf Fachgebiete der einsendenden Ärzte, n=43

4.2.3 Charakteristik der Studienpopulation und der abdominalen Venenthrombosen

Die Altersverteilung der 43 Patienten mit aktueller oder stattgehabter abdominalen Venenthrombose in Mecklenburg-Vorpommern lag bei Probeneingang zwischen 28 und 84 Jahren (Durchschnittsalter: 59 Jahre). Unter den 43 Patienten waren 26 (60 %) Männer, im Alter von 28 bis 84 Jahren (durchschnittlich: 57 Jahre) und 17 (40 %) Frauen im Alter von 30 bis 80 Jahren (durchschnittlich: 59 Jahre).

Der größte Anteil von 33 (77 %) der abdominalen Venenthrombosen wurden kürzlich (ab 2016) diagnostiziert, ein früheres Diagnosedatum (zwischen 1998 und 2015) wiesen 6 (14 %) abdominale Venenthrombosen auf, 4 (9 %) weitere Proben blieben ohne Angabe zum Diagnosedatum.

Die Lokalisation der Thrombosen wurde auf dem klinischen Fragebogen mit den Auswahlmöglichkeiten „ja“, „nein“ und „nicht bekannt“ für Pfortader, Lebervenen, Milzvene angegeben. Die Manifestation in anderen Venen wurde ebenfalls mit der angegebenen Auswahlmöglichkeit erfasst, wobei zusätzlich die Lokalisation als Freitextangabe erfragt wurde.

Ergebnisse

Tabelle 16 zeigt die genannten Thromboselokalisationen und deren Häufigkeit, eine Mehrfachnennung war hier möglich.

Tabelle 16 Häufigkeiten der Lokalisationen der abdominalen Venenthrombosen, laut klinischem Fragebogen, Mehrfachnennung möglich

Lokalisation der abdominalen Venenthrombose		Häufigkeit
Pfortader		33 (77 %)
Milzvene		19 (44 %)
Mesenterialvenen		17 (40 %)
Lebervenen		4 (9 %)
Andere Venen		8 (19 %)
	Konfluenzvene	1 (2 %)
	Testikularvene links	1 (2 %)
	Beinvenenthrombose	2 (5 %)
	Thrombose der Hohlvene	1 (2 %)
	Nierenvene links	1 (2 %)
	Parauterine Venen	1 (2 %)
	Ohne Angabe	1 (2 %)

4.2.4 Angegebene Symptome

Die Angabe zu klinischen Beschwerden war auf dem klinischen Fragebogen im Freitext zu beantworten, es kam zur Nennung von unterschiedlichen Symptomen und Mehrfachnennungen.

Die zu den abdominalen Venenthrombosen angegebenen Symptome wurden in Gruppen zusammengefasst und sind in Tabelle 17 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 17 Klinische Beschwerden laut Angabe auf dem klinischen Fragebogen, Mehrfachnennung möglich

Symptome	Häufigkeit Symptome
Abdominale Schmerzen	19 (44 %)
Übelkeit, Erbrechen, Flatulenzen, Durchfall	4 (9 %)
Gastrointestinale Blutungen	6 (14 %)
Pankreatitis, Cholangitis, Aszites, Peritonitis	5 (12 %)
Fieber, Schüttelfrost	2 (5 %)
Leberwertveränderungen, Leberzirrhose	2 (5 %)
Rezidivierende Thrombosen	1 (2 %)
Keine Symptome	9 (21 %)

4.2.5 Angewandte diagnostische Methoden und Therapiestrategien

Die abdominale Venenthrombose wurde über verschiedene Methoden diagnostiziert. Der klinische Fragebogen enthielt zur verwendeten Diagnostik folgende Antwortvorgaben: Sonographie (Sono), Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Operation (OP). Es erfolgte unter anderem die Nennung von Kombinationen der Verfahren. Abbildung 16 zeigt die Häufigkeiten der Verwendung der verschiedenen diagnostischen Methoden.

Ergebnisse

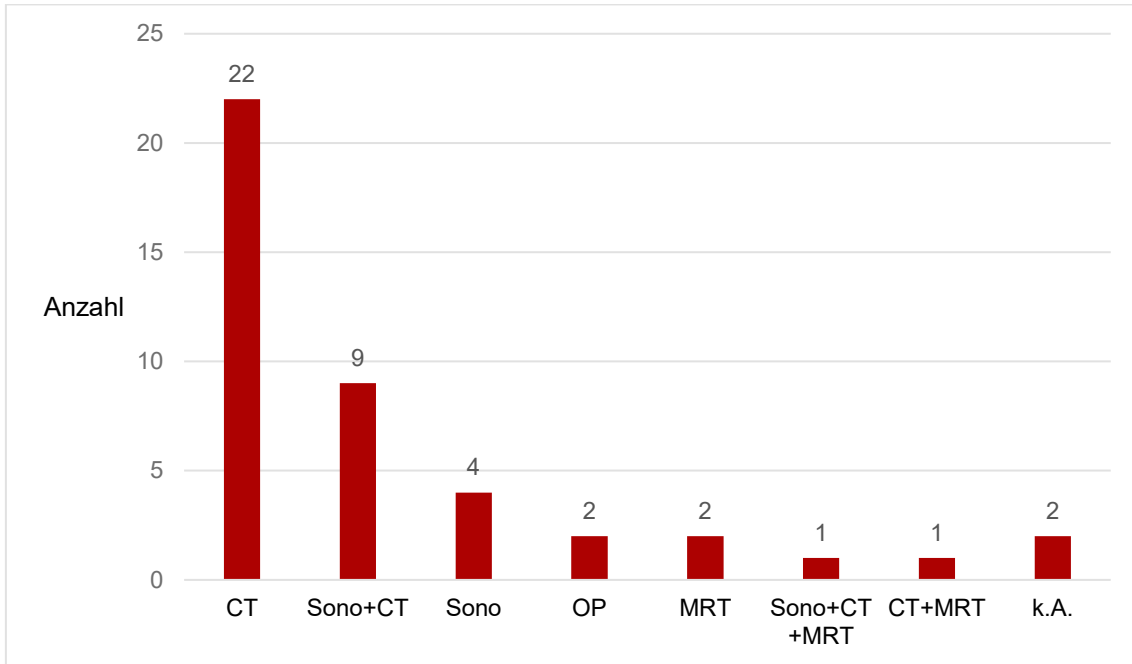


Abbildung 16 Häufigkeit der Diagnoseverfahren zur Detektion der abdominalen Venenthrombose laut klinischem Fragebogen, n=43, keine Angabe (k.A.)

Neben der diagnostischen Methode wurde auch die Therapiestrategie auf dem klinischen Fragebogen eruiert. Abbildung 17 zeigt die Häufigkeiten der angewendeten Therapiestrategien. Die Antikoagulation ist mit Abstand die am häufigsten gewählte Therapievariante.

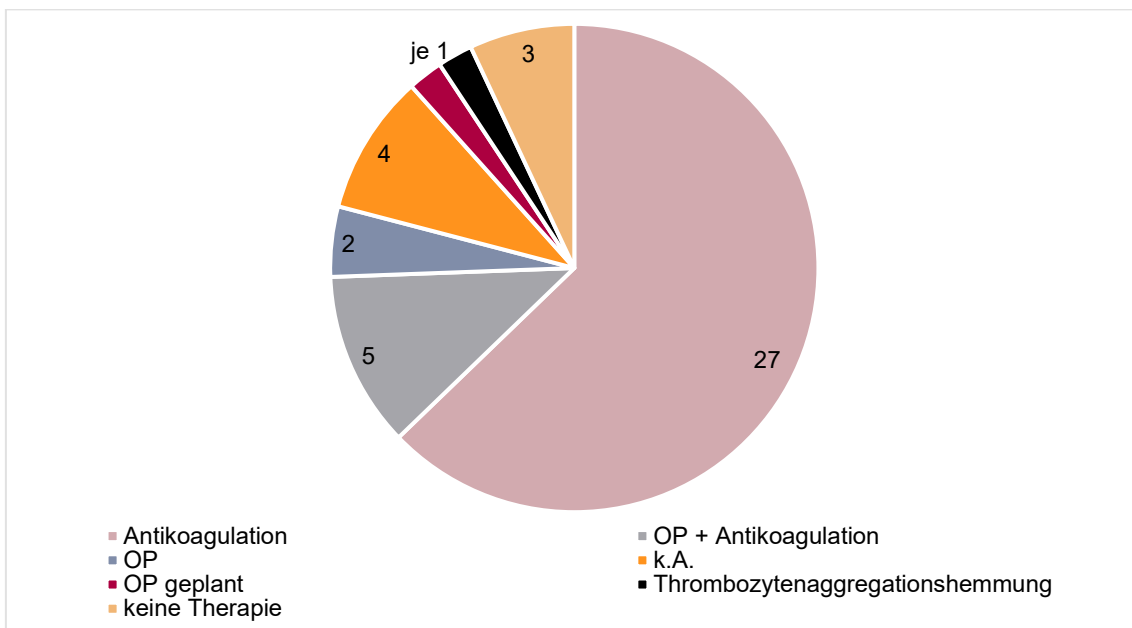


Abbildung 17 Verteilung der Therapiestrategien der abdominalen Venenthrombose laut klinischem Fragebogen, n=43

Ergebnisse

Zur Möglichkeit einer Antikoagulation wurde auf dem klinischen Fragebogen nach der Art der Antikoagulation gefragt, und dies war in Form eines Freitextes zu beantworten. Eine Antikoagulation wurde insgesamt bei 32 Patienten angewendet, um die abdominale Venenthrombose zu therapieren. Tabelle 18 zeigt die Häufigkeiten der zur initialen Therapie gewählten Antikoagulantien.

Tabelle 18 Häufigkeiten der initial zur Therapie gewählten Antikoagulantien, NMH: niedermolekulare Heparine, NOAK: neue orale Antikoagulantien, n = 32

Antikoagulans	Häufigkeit des initial gewählten Antikoagulans
NMH	14 (33 %)
NOAK	7 (16 %)
Heparin	5 (12 %)
Vitamin K Antagonisten	3 (7 %)
Keine Angabe	3 (7 %)

4.2.6 Klinische Charakteristika

Folgende ergänzenden Angaben zu den klinischen Charakteristika Hepatomegalie und Splenomegalie wurden wie in Tabelle 19 abgebildet, erhoben.

Tabelle 19 Vorhandensein von Cofaktoren für abdominale Venenthrombosen laut klinischem Fragebogen, n = 43

	Ja	Nein	Nicht bekannt	Keine Angabe
Hepatomegalie	6 (14 %)	31 (72 %)	5 (12 %)	1 (2 %)
Splenomegalie	23 (53 %)	15 (35 %)	4 (9 %)	1 (2 %)

Die auf dem klinischen Fragebogen angegebenen Blutwerte (Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin) zeigten große Wertspannen.

Leukozytenzahl: 1,83 - 26,1 GPT / l

Thrombozytenzahl: 27 - 572 GPT / l

Hämoglobin: 4,0 - 9,9 mmol / l

Ergebnisse

Auf dem klinischen Fragebogen wurde nach Begleiterkrankungen, sofern bekannt, gefragt.

Für die Abfrage der Begleiterkrankungen Leberzirrhose, Z. n. Thromboembolie, Thrombophilie und Tumorerkrankungen waren die Antwortmöglichkeiten „Ja“, „Nein“ und „Nicht bekannt“ vorgegeben.

Tabelle 20 zeigt die zu den Begleiterkrankungen Leberzirrhose und Z. n. Thromboembolie erhobenen Ergebnisse.

Tabelle 20 Häufigkeiten von Leberzirrhose und Thromboembolien in der Anamnese n = 43

	Ja	Nein	Nicht bekannt	Keine Angabe
Leberzirrhose	6 (14 %)	29 (67 %)	8 (19 %)	0
Z.n. Thromboembolie	5 (12 %)	28 (65 %)	7 (16 %)	3 (7 %)

Das Vorkommen von Thrombophilien und Tumorerkrankungen wurde ähnlich abgefragt und dokumentiert. Bei positiver Beantwortung der Abfrage wurde zusätzlich die Entität der Erkrankung abgefragt.

Die Frage nach Thrombophilien wurde in zwei Fällen mit „ja“ beantwortet (5%). Darunter wurde in einem Fall Faktor V Leiden genannt, im zweiten Fall blieben genauere Angaben aus. In 22 (51 %) Fällen wurde eine Thrombophilie verneint, in 18 (42 %) Fällen als nicht bekannt vermerkt, nur zu einem Patienten wurde diesbezüglich keine Angabe gemacht.

Die Ergebnisse zur Abfrage von Tumorerkrankungen in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 Häufigkeiten von Tumorerkrankungen laut klinischem Fragebogen, n = 43

	Ja	Welche		Nein	Nicht bekannt
Tumorerkrankung	11 (26 %)	Pankreas Ca.	4	23 (53 %)	9 (21 %)
		Non-Hodgkin-Lymphome	2		
		Rektum Ca.	1		
		Cholangiozelluläres Ca.	1		
		Gastroösophageales Ca.	1		
		V.a. Leukämie	1		
		Keine Angabe	1		

4.2.7 Charakterisierung der Patienten mit detektierter Punktmutation

Die Patienten mit detektierter Punktmutation waren bei Probeneingang im Durchschnitt 64 Jahre alt. Unter diesen Patienten fanden sich 6 Frauen und 7 Männer mit einem Durchschnittsalter von 66 Jahren bzw. 62 Jahren. Es zeigte sich in dieser Gruppe in Bezug auf Thromboselokalisation, klinischen Beschwerden, klinischen Charakteristika, Begleiterkrankungen und erhobene Blutparameter keine relevanten Unterschiede zu der Gesamtpatientengruppe.

4.2.8 Zytomorphologische Charakterisierung

Die Anzahl auswertbarer Blutausstriche setzt sich wie folgt zusammen:

Probenzahl gesamt:	43
- Aus logistischen Gründen nicht angefertigte Proben:	2
- Aufgrund langer Probentransportdauer nicht auswertbare Proben:	4
ergibt die Anzahl auswertbarer Proben von:	37

Unter den 37 auswertbaren Proben konnten 29 (78 %) Differentialblutbilder als unauffällig identifiziert werden.

Eine Linksverschiebung konnte in 5 (14 %), eine Rechtsverschiebung des Differentialblutbildes in 3 (8 %) der Ausstriche identifiziert werden.

Ein Ausstrich (MPN38) zeigte typische Blutbildveränderung der MPN. Hier fanden sich als Vorstufen der erythrozytären Hämatopoese Normoblasten. Während der Differenzierung von 100 Leukozyten konnten 31 Normoblasten identifiziert werden. Die Erythrozyten wiesen darüber hinaus basophile Tüpfelungen, Polychromasie und Anisozytose auf. Die Anzahl der Thrombozyten zeigte sich vermindert, allerdings fanden sich Riesenthrombozyten. Abbildung 18 zeigt einen Ausschnitt des Blutausstriches der Probe MPN38 in 400-facher Vergrößerung. Zentral gelegen ein Normoblast sowie ein Riesenthrombozyt. Eindrücklich ist auch die Anisozytose der Erythrozyten mit vereinzelt basophiler Tüpfelung und eine deutliche Rarifizierung der Thrombozyten in diesem Ausschnitt.

Ergebnisse

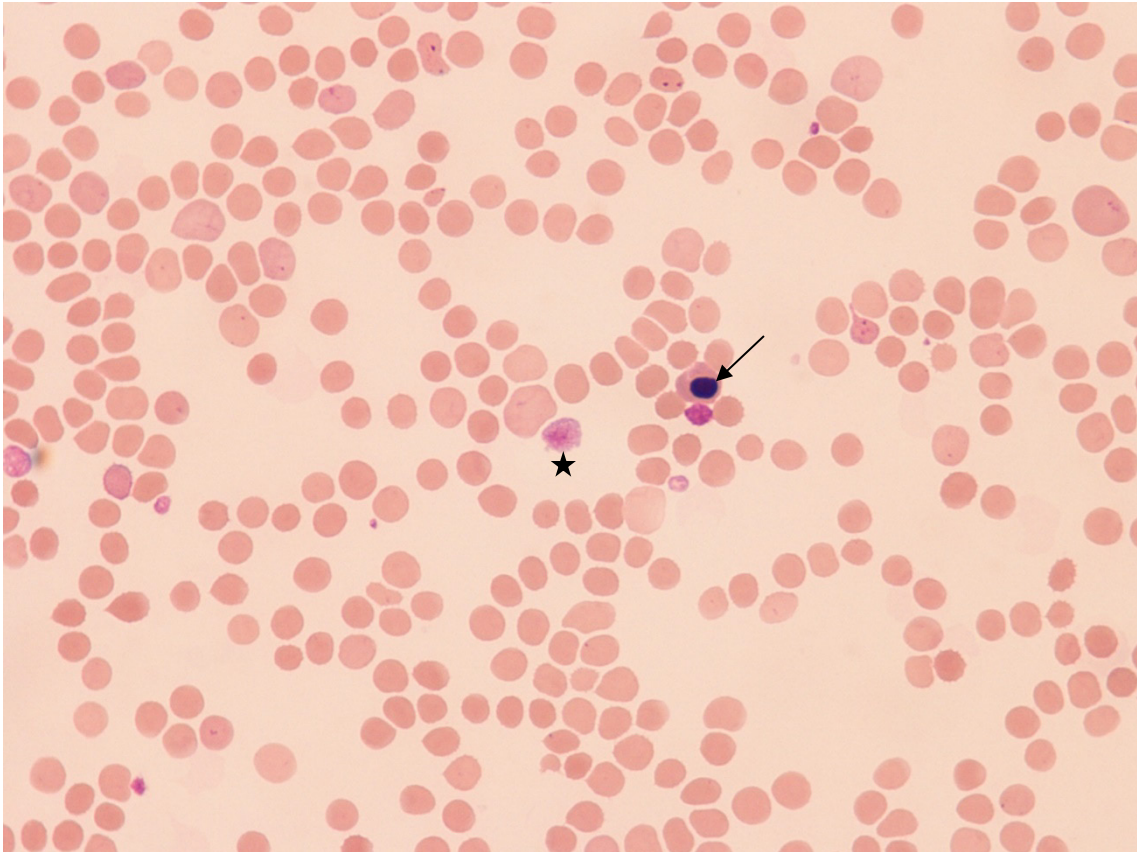




Abbildung 18 Blutausstrich der Probe MPN38 in 400-facher Vergrößerung.

Der Pfeil  markiert einen Normoblast, der Stern  einen Riesenthrombozyt.

Insgesamt konnten bei vielen der angefertigten Blutausstriche morphologische Veränderungen unterschiedlicher Zellreihen identifiziert werden. Tabelle 22 zeigt die häufigsten morphologischen Veränderungen. Dargestellt sind hier die sieben durch NGS auf eine Hotspot Mutation positiv detektierten Proben im Vergleich zu den Ergebnissen aller Blutausstriche. Die als positiv mutiert detektierten Proben unterscheiden sich nicht von der Gesamtheit der Proben.

Ergebnisse

Tabelle 22 Morphologische Veränderungen in den Blutausstrichen der Proben mit Nachweis der *JAK2*-Mutation im Vergleich der morphologischen Veränderungen aller Ausstriche

Morphologische Veränderung	MPN 11	MPN 18	MPN 30	MPN 38	MPN 42	MPN 43	MPN 44	Häufig- keit Gesamt (n=37)
Leukozyten								
Linksverschiebung	Ja	-	-	-	-	-	-	5 (14 %)
Rechtsverschiebung	-	-	-	-	-	-	-	3 (8 %)
Erythrozyten								
Tränentropfenformen	-	-	Ja	-	Ja	-	-	11 (30 %)
Anisozytose	Ja	Ja	-	Ja	-	-	-	17 (46 %)
Basophile Tüpfelungen	Ja	-	-	Ja	-	-	-	7 (19 %)
Erythrozytäre Vorstufen	Retikulo- zyten	-	-	-	Ja	-	-	3 (8 %)
	Normo- blasten	-	-	-	Ja	-	-	1 (3 %)
Thrombozyten								
Riesenthrombozyten	Ja	Ja	Ja	Ja	-	Ja	Ja	27 (73 %)
Thrombozytenaggregate	-	-	-	-	-	Ja	-	16 (43 %)

Deutlich auffällig waren die häufigen morphologischen Veränderungen der Thrombozyten. In 27 (73 %) der insgesamt 37 Blutausstriche konnten Riesenthrombozyten (beispielhaft zu sehen in Abbildung 19) identifiziert werden. Vergleichbare Thrombozytenaggregate wie in Abbildung 20 fanden sich in 16 (43 %) der Ausstriche.

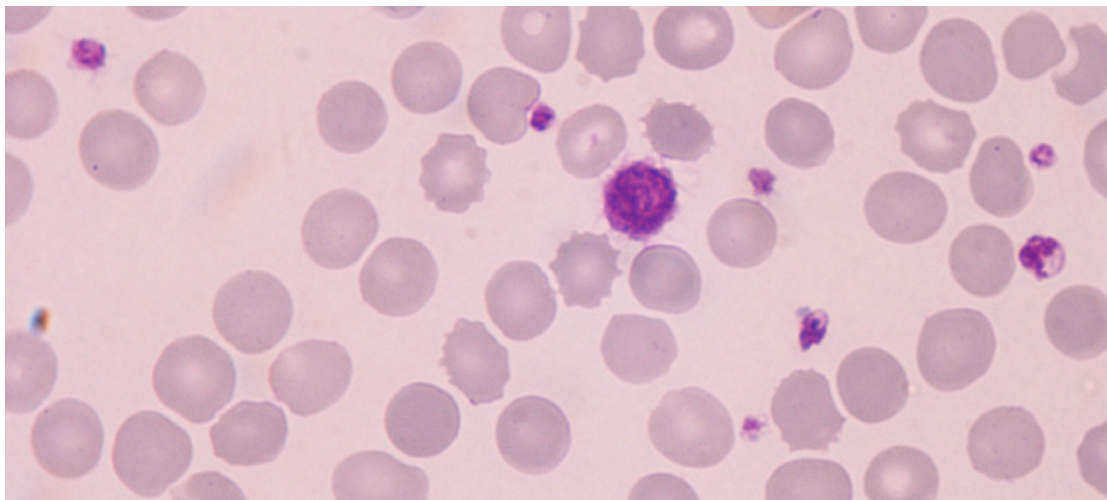


Abbildung 19 Ausschnitt eines Blutausstriches: Riesenthrombozyt.
Zentral gelegener aktivierter Riesenthrombozyten (1000-fache Vergrößerung)

Ergebnisse

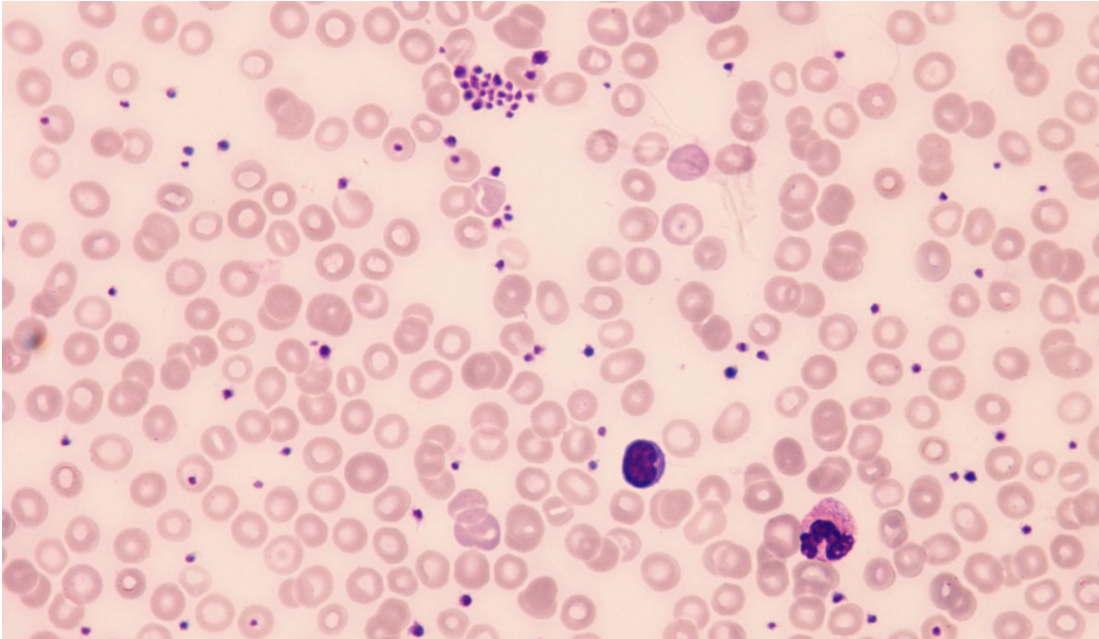


Abbildung 20 Ausschnitt eines Blutausstriches: Thrombozytenaggregat.

Im oberen Bildfeld gelegenes kleineres Thrombozytenaggregat, ein Lymphozyt und ein neutrophiler Granulozyt (400-fache Vergrößerung)

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein targeted NGS Panel zur Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* etabliert und evaluiert. Das Panel wurde im Anschluss im Rahmen der Studie „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen in Mecklenburg-Vorpommern“ angewendet.

Das etablierte NGS Panel erlaubte die stabile Detektion niedriger Allelfrequenzen der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR*. Ein Erreichen der „Mindestabdeckung“ der Amplikons von 500 Reads (Cut off 2 %) war kontinuierlich sicher gegeben. Im überwiegenden Verlauf wurde an Hotspot Regionen eine Abdeckung von mehr als 2000 Reads erreicht. Die hohe und ausgewogene Abdeckung des Panels erlaubt eine sichere Detektion von Allelfrequenzen auch in niedrigen Bereichen unter dem konventionellen „Cut off“ von 2 %. Diese hohe Sensitivität ließ sich durch Anfertigung von Tumor-DNA Verdünnungsreihen für Hotspots der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* nachweisen.

In der anschließenden Verwendung des NGS Panels im Rahmen der durchgeführten prospektiven Studie „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ konnten sieben von 43 (16,3 %) Proben mit einer *JAK2* p.V617F Mutation über dem konventionellen Cut off von 2 % identifiziert werden. Des Weiteren wurden in der Studienkohorte bei sechs Proben Mutationen in sehr niedrigen Allelfrequenzen (< 2 %) detektiert. Die Prävalenz der Gesamtaberrationen konnte durch die Detektion niedriger Allelfrequenzen somit nahezu verdoppelt werden.

Neben den Hotspot Mutationen konnten eine Vielzahl weiterer Aberrationen in der proteinkodierenden Sequenz der drei untersuchten Gene detektiert werden. Die Einordnung nach somatischen Mutationen und Populationspolymorphismen (germe line variants) sowie Beschreibung dieser etwa 170 weiteren Varianten sollte jedoch nicht Fokus dieser Arbeit sein.

Bezüglich der konventionellen hämatologischen Diagnostik (Blutbild, manuelle Differenzierung eines peripheren Blutausstrichs) ließen sich keine validierten Unterscheidungskriterien zwischen Patienten mit oder ohne MPN-verursachender Mutation finden.

Diskussion

In den durch einen klinischen Fragebogen erhobenen Daten zeigte sich eine große Vielfalt an Symptomen. Diese Varianz entspricht der Konsultation der Patienten mit abdominalen Venenthrombosen bei unterschiedlichsten Fachdisziplinen.

5.1 Sensitives Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung von *JAK2*, *MPL*, *CALR*

Das NGS Panel konnte erfolgreich für die Sequenzierung der Zielsequenzen etabliert werden: darunter die Hotspot Mutationen für *JAK2* auf Exon 14 (insbesondere p.V617F) und Exon 12 (z.B.: p.D620E; p.C618R; p.L611C), *MPL* (p.S505N; p.A506T; p.W515R; p.W515A; p.W515S; p.A519T) und *CALR* (Frameshift Mutationen von Typ 1 und 2). Das verwendete Panel zeigte eine ausgewogene Generierung aller Amplikons somit eine gute Amplifikationsperformance, der einzelnen Nukleinsäurebereiche. Darüber hinaus wurden die DNA-Stränge in plus und minus Richtung ausgeglichen sequenziert. Insgesamt konnte bei den untersuchten Proben eine gleichmäßige Sequenziertiefe unabhängig des Untersuchungszeitpunktes im Rahmen des Untersuchungszeitraumes (24 Monate) beobachtet werden. Die Erstellung von Tumor-DNA Verdünnungen und deren anschließende Sequenzierung zeigte sich trotz Verwendung kleiner Mengen der Proben mit einer sehr hohen Genauigkeit. Für die Hotspot Mutationen in *JAK2* (p.V617F) und *MPL* (p.W515L) konnten die erstellten Verdünnungen mit errechneter Allelfrequenz bis 1 % mit guter Korrelation sequenziert werden. Bei der *CALR* Frameshift Mutation vom Typ 1 zeigte die 5 %ige Verdünnung eine gute Korrelation.

Maslah et al verglichen die Sensitivität der Methoden NGS und qPCR anhand von 427 Patientenproben, darunter wurden 301 als im *JAK2* Gen mutiert beschrieben werden.²² Im Bereich geringer Allelfrequenzen wurden durch das NGS 22 Proben als falsch negativ detektiert, allerdings wurden drei Proben durch das NGS als im *JAK2* Gen mutiert identifiziert, hier lag die Mutation nicht an dem von der qPCR abgebildeten Bereich.²² Diese Ergebnisse zeigen, dass die technisch stabilere Detektion im Bereich niedrigerer Allelfrequenzen bei PCR Methoden (z.B. digital droplet PCR) jedoch in der Regel auf die Analyse einer

Diskussion

einzelnen Mutation in einem Reaktionsansatz beschränkt ist. Der nur geringe Sensitivitätsverlust des NGS im Vergleich zu digital droplet PCR/qPCR im Bereich geringer Allelfrequenzen wird durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz und damit die Detektion von weiteren Mutationen, Mutationsvarianten und Beimutationen ergänzt. Dadurch ergibt sich zum einen ein Zeitersparnis bei der Untersuchung komplexer molekularer Signaturen durch das NGS. Andererseits ist auch die Detektion weiterer Mutationen möglich. So berichten Wu et. al. die Identifikation von Mutationen durch NGS bei Patienten, welche zuvor als nicht mutierte MPN klassifiziert wurden.²³

Eine aktuell genutzte Sensitivitätsgrenze mit einem Cut off bei 2 % – obwohl technisch die Möglichkeit besteht, durchaus geringere Allelfrequenzen abzubilden – soll insbesondere in diagnostischer Verwendung einer falsch-positiven Befundung entgegenwirken. Ein statistischer Fehler beim Auswerten der Reads lässt sich hier jedoch auch durch eine ausreichend hohe Abdeckung von > 2000 Reads mit höherer Wahrscheinlichkeit ausschließen. Des Weiteren sind Sequenzierfehler denkbar, welche die Aussagekraft des NGS in seiner oben beschriebenen Form im Bereich niedriger Allelfrequenzen eingrenzen könnte. Hier ist eine Möglichkeit zur Absicherung der Aussage über die Verwendung von sog. „unique molecular identifiers“ (UMI) möglich. UMI sind einmalige Identifikatoren, welche noch vor der ersten Vervielfältigung der DNA (durch PCR) an die originäre Proben-DNA legiert werden. Jedes Amplikon kann anschließend als mit einem UMI markiert und damit als ohne Sequenzierfehler identifiziert werden.²⁴

5.2 Kritische Betrachtung der Probenakquise

Die Probenakquise erreichte eine Probenanzahl von 43 Patienten in dem Zeitraum von 22.02.2017 bis 20.02.2019. Dabei wiesen 33 dieser Proben ein aktuelles Diagnosedatum auf. Bei rund 1,6 Millionen Einwohner in Mecklenburg-Vorpommern sind nach den in der Literatur beschriebenen Inzidenzen von abdominalen Venenthrombosen etwa 69 Patienten in den zwei Jahren mit einer abdominalen Venenthrombose zu erwarten.¹⁷⁻¹⁹ Die Rekrutierung der Proben in

Diskussion

einem Flächenland Mecklenburg- Vorpommern mit mitunter langen Informations- und Transportwegen kann mit 43 für den Zeitraum von 24 Monaten als erfolgreich bewertet werden.

Im Studienverlauf wurden viele Einsendungen von gastroenterologischen Stationen beobachtet. Daher wurden im Verlauf (sieben Monate nach Studienbeginn) auch die niedergelassenen Gastroenterologen gezielt zur Studienteilnahme aufgefordert.

Von insgesamt 43 Patientenproben konnten in 37 Fällen Blutausstriche angefertigt und beurteilt werden. Zwei Proben wurden aus logistischen Gründen nicht ausgestrichen. Aufgrund der Transportentfernungen und Versanddauer im Flächenland Mecklenburg-Vorpommern war für vier Proben der angefertigte Blutausstrich nicht auswertbar.

Die Untersuchung der Blutausstriche zeigte Veränderungen von Thrombozyten in 31 (84 %) Fällen in Form von Riesenthrombozyten, Thrombozytenaggregaten oder die Kombination der beiden Veränderungen. Diese könnten Ausdruck einer Thrombozytenaktivierung sein. Eine vermehrte Thrombozytenaktivität ist als ein Faktor zur Entstehung von abdominalen Venenthrombosen beschrieben, da die immunogen wenig geschützten Endothelien der Portalvenen als für aktivierte Thrombozyten vulnerabel eingeschätzt werden.²⁵ Dennoch wird die Ausbildung einer abdominalen Venenthrombose als multikausal gewertet.²⁶ Risikofaktoren für die Ausbildung einer MPN-assoziierten abdominalen Venenthrombose sind laut Literatur junges Alter, weibliches Geschlecht, zusätzliche Faktoren der Hyperkoagulabilität und das Vorkommen der *JAK2* p.V617F Mutation.²⁷ Unabhängig des *JAK2*-Mutationsstatus wurden zusätzliche Mutationen beschrieben, welche an der Genese der MPN und der abdominalen Venenthrombosen Anteil haben, darunter vor allem Mutationen im Tumorsuppressorgen *TET2*, dessen Auftreten nicht spezifisch für die Entwicklung einer MPN ist, sondern vielmehr als Risikofaktor für die Entstehung vieler myelodysplastischer Erkrankungen steht.²⁸ Neben Mutationen im *TET2* Gen konnten weitere, ähnlich unspezifische Mutationen bei MPN assoziierten abdominalen Venenthrombosen identifiziert werden, darunter Mutationen der Gene *DNMT3A*, *EZH2* und *ASXL1*.²⁷

5.3 Abdominale Venenthrombosen in Mecklenburg-Vorpommern

Die Studie erzielte eine Einsendung von 43 Patientenproben mit stattgehabter abdominaler Venenthrombose. Mit einer Prävalenz von 16,3 % konnten Mutationen im Gen *JAK2* über dem konventionellen Cut off von 2 % nachgewiesen werden. Durch die angewandte hochsensitive Methode wurden sechs weitere Hotspot Mutationen detektiert: Dabei handelt es sich bei vier Proben um *JAK2* p.V617F mit Allelfrequenzen von 0,2 %; 0,6 %; 1,4 % und 0,3 % und bei zwei Proben um *MPL* p.W515R mit Allelfrequenzen von 1,2 % und 0,2 %. Für letztere lag zusätzlich eine *JAK2* p.V617F Mutation mit einer Allelfrequenz von 28,2 % vor. Die Koexistenz von zwei Treibermutationen wurde vereinzelt in Fallberichten beschrieben und stellt ein seltenes Ereignis in unter 1 % der Fälle dar.²⁹ Makarik et. al. konnten in einer Studie bei der Sequenzierung von 1958 Proben in 23 Fällen mit *CALR* Mutation ebenfalls eine *JAK2* Mutation mit überwiegend niedrigen Allelfrequenzen (< 1 %) nachweisen.³⁰

Die Prävalenz der *JAK2*-Mutationen in der vorliegenden Arbeit erfuhr durch die Berücksichtigung geringer Allelfrequenzen eine Steigerung um 57,1 %. Die Prävalenz der Gesamtaberrationen sogar um 85,7 % in der untersuchten Kohorte.

Eine prospektive Prävalenzstudie zu abdominalen Venenthrombosen in Irland zeigte eine *JAK2* p.V617F Prävalenz von 18,8 %, *MPL*-Mutationen konnten in 3,4 % detektiert werden, *CALR*-Mutationen wurden in keinem Fall detektiert.³¹ Eine retrospektive Studie unter Einschluss von 209 Patienten mit abdominaler Venenthrombose konnte Mutationen von *CALR* mit einer Prävalenz von 1,9 % zeigen.³²

Die durch den klinischen Fragebogen erfassten Daten zu den abdominalen Venenthrombosen, der Patientenanamnese und den erfassten Blutwerten ließen keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne *JAK2* p.V617F Mutation beobachten. Anamnese und klinisches Bild waren vielseitig. Diese Vielseitigkeit spiegelt sich auch in der Breite der einsendenden medizinischen Fachdisziplinen wider. Zwölf Einsendungen kamen aus gastroenterologischen Fachbereichen, das Symptom der gastrointestinalen Blutung wurde in sechs Fällen aufgeführt. Auch Brito et. al. berichten von einem Patienten mit oberer gastrointestinaler Blutung in Folge einer Thrombose der Pfortader als erstes Symptom einer ET.³³

Diskussion

Kleinere Studien beschreiben die Prävalenz der *JAK2* p.V617F Mutation uneinheitlich zwischen 10 %^{34,35} bis über 50 %³⁶. Auch die Ergebnisse größerer Kohortenstudien weisen unterschiedlichste Prävalenzen in einem ähnlichen Bereich auf.³⁷ Diese Diskrepanz könnte unter anderem durch unterschiedlicher Einschlusskriterien erklärt sein. Ähnlich der hier dargestellten Studie wurden oft alle abdominalen Venenthrombosen berücksichtigt, in einigen Studien wurde hauptsächlich das Budd-Chiari Syndrom beschrieben.³⁷ Häufig wurden auch Patienten mit bereits bekannter MPN ausgeschlossen.³⁵

Kiladjian et al. detektierten in einer großen retrospektiven Multizenterstudie die *JAK2* p.V617F Mutation in 94 von 241 (39%) Fällen abdominaler Venenthrombosen.³⁸ Eine Metaanalyse retrospektiver Studien zeigte das Vorkommen der *JAK2* p.V617F Mutation bei Patienten mit Budd-Chiari Syndrom oder portaler Venenthrombose und ohne weitere Hinweise auf MPN mit einer Prävalenz von 17,1 % bzw. 15,4 %.³⁹ Mit der Aufnahme aller abdominalen Venenthrombosen ohne Ausschlusskriterien konnte in der vorliegenden Arbeit mit 16,3 % für Mutationen über den konventionellen Cut off von 2 % ein vergleichbares Ergebnis gezeigt werden.

Das Auftreten von abdominalen Venenthrombosen zeigte sich in der hier beschriebenen Studie zwischen männlichen und weiblichen Patienten ausgeglichen. Colaizzo et al beschrieben hingegen, dass Frauen mit abdominaler Venenthrombose häufiger die *JAK2* p.V617F Mutation tragen.⁴⁰ Auch das durchschnittliche Alter von Männern (59 Jahre) und Frauen (57 Jahre) zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ausgewogen. In der von Smalberg et al. untersuchten Patientenkohorte waren Frauen bei Diagnosestellung jünger und wiesen geringere Allelfrequenzen der Mutation auf.³⁹ Auch Stein et al. beschrieben geringere Allelfrequenzen der *JAK2* p.V617F Mutation während der Diagnosestellung eines MPN bei Frauen.⁴¹ Ein Unterschied in den Allelfrequenzen konnte in der hier durchgeführten prospektiven Untersuchung bei Auftreten der abdominalen Venenthrombose auch aufgrund geringer Fallzahlen nicht detektiert werden. Eine retrospektive Studie unter Einschluss von 207 Patienten mit MPN konnte ebenfalls keine Unterschiede in Bezug auf Häufigkeit, Zeitpunkt und Patientenalter bei Auftreten einer abdominalen Thrombose zwischen den Geschlechtern aufzeigen.⁴²

Diskussion

Die häufigste Lokalisation der abdominalen Venenthrombose war die Pfortader bei 33 (77 %) Patienten. Des Weiteren war die Milzvene in 19 (44 %) und die Mesenterialvenen in 17 (40 %) Fällen betroffen. Eine aktuelle retrospektive Studie zu abdominalen Venenthrombosen bei MPN berichtet vergleichbare Zahlen zur Thromboselokalisation (Pfortader 67,4 %, Milzvene 29,3 %, Mesenterialvenen 24,3 %).⁴³ Auch die Antikoagulation als Therapiestrategie nach abdominaler Venenthrombose zeigte sich in der retrospektiven Studie mit 84,6 %⁴³ übereinstimmend mit in dieser Arbeit erhobenen 75 %.

5.3.1 Ein Einzelfall: Hohe Allelfrequenzen

Von den sieben Patientenproben mit Nachweis der Mutation *JAK2* p.V617F zeigte nur eine Probe in der zytomorphologischen Beurteilung Veränderungen eines MPN. Diese Probe wies zudem die höchste Allelfrequenz für *JAK2* p.V617F innerhalb der vorliegenden Arbeit von 43 % auf. Folgende klinische Daten waren dem Fragebogen zu entnehmen. Der jetzt 69-jährige männliche Patient hatte die erste Manifestation einer abdominalen Venenthrombose 1998. Als klinische Symptome wurden Aszites, Teerstuhl und ein hepatorenales Syndrom angegeben. Als thromboembolische Erkrankung erlitt der Patient zusätzlich AV-Fistel-Thrombosen. Eine Splenomegalie war bekannt, außerdem zeigte sich eine Thrombozytopenie und Anämie. Bereits ohne den Nachweis einer Mutation von *JAK2* wäre hier der Verdacht auf ein MPN zu stellen.

5.4 Bedeutung niedriger Allelfrequenzen bei abdominalen Venenthrombosen

Mit Zunahme der diagnostischen Möglichkeiten und molekularen Methoden ergeben sich immer wieder neue Konzepte der Pathogenese einer abdominalen Venenthrombose. Dabei scheint die Blutzellzahl nicht das vorrangige pathophysiologische Prinzip zu sein. Vielmehr scheinen bisher noch nicht vollständig aufgeklärte molekulare Mechanismen in den Lumina der abdominalen Gefäße an der Genese dieser teils schwerwiegenden Komplikation der MPN beteiligt. *Wautier* und *Wautier* demonstrierten die erhöhte Adhäsion roter Blutzellen von Patienten mit PV an endotheliales Laminin.⁴⁴ Abdominale Venen stehen zudem unter dem Einfluss immunogener Substanzen aus dem

Diskussion

Verdauungstrakt, dies könnte die Gefäße für aktivierte Thrombozyten besonders vulnerabel machen.²⁵ Bei der Entstehung abdominaler Venenthrombosen spielt dementsprechend möglicherweise nicht die Anzahl sondern vielmehr die Funktionsveränderung der Zellen eine Rolle.²⁷ Matsuura et. al. beschreiben bei *JAK2* V617F mutierten Mäusen Veränderungen in Thrombozyten, welche im direkten Blutungsversuch zu verminderter Funktion führten.⁴⁵ Eaton et. al. zeigten jüngst eine Funktionsminderung bei Thrombozyten von Mäusen mit *JAK2* Mangel.^{45,46}

Nielsen et al. konnten zeigen, dass die Allelfrequenzen von *JAK2* p.V617F mit der Entwicklung und Progression von MPN assoziiert sind.⁴⁷ Eine retrospektive Analyse von 52 Patienten mit abdominaler Thrombose und gleichzeitiger MPN zeigte im Vergleich mit einer Kontrollgruppe bestehend aus 134 MPN Patienten eher im Normbereich liegende Blutbilder und eine niedrigere Allelfrequenz bei Diagnosestellung.⁴⁸ Daraus resultieren zwei weit verbreitete Hypothesen. Einerseits scheint die abdominale Venenthrombose eine im frühen Krankheitsverlauf auftretende Komplikation zu sein. Andererseits scheint diese nicht direkt mit Quantität somatisch mutierter Zellen im Zusammenhang zu stehen. Eine Follow-up Studie mit 121 eingeschlossenen Patienten konnte zeigen, dass Patienten, welche eine abdominale Venenthrombose erlitten, erst Jahre später ein MPN nach WHO-Kriterien entwickelten.⁴⁹ Dabei waren sowohl Patienten betroffen, welche zum Zeitpunkt der abdominalen Venenthrombose bereits eine *JAK2*-Mutation aufwiesen, als auch Patienten, welche zum Ereigniszeitpunkt keine Punktmutation aufwiesen.⁴⁹ Ein Teil dieser Patienten konnte im Verlauf ebenfalls als *JAK2* mutiert identifiziert werden.⁴⁹

Neben den Mutationen in *JAK2*, *MPL* und *CALR* wurden bei Patienten mit MPN ebenfalls Veränderungen der Gene *TET2*, *DNMT3A* und von weiteren nachgewiesen.^{50,51} Diese Mutationen scheinen solitär, aber auch im Zusammenhang mit *JAK2*-Mutationen an chronischen Entzündungsvorgängen und maligner Entartung von Zellklonen beteiligt zu sein.⁵¹ Weitere Untersuchungen beschreiben, dass neben der direkten Punktmutation p.V617F der *JAK2* Haplotyp 46/1 eine Rolle in der Entwicklung eines *JAK2* positiven MPN spielt.^{52,53} Neben der höheren Wahrscheinlichkeit, ein *JAK2* positives MPN zu

Diskussion

entwickeln, zeigte sich in einer Studie auch eine deutliche Assoziation des *JAK2* Haplotypes bei der Entstehung einer abdominalen Venenthrombose.⁵⁴

Hochsensitive Methoden und das Auswerten großer Datenmengen ermöglichen immer neue Erkenntnisse zu Aberrationen und ihren Auswirkungen. Die molekulargenetische Diagnostik gewinnt zunehmend an Bedeutung für viele Patienten. Die erst kürzlich beschriebene „Clonal hematopoiesis of Indeterminate Potential“ (CHIP) – auf Deutsch klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential – beschreibt das Vorhandensein somatischer Mutationen ohne klinische Anzeichen einer Neoplasie.⁵⁵ CHIP beschreibt hier das Vorhandensein genetischer Mutationen, welche in Erkrankungen wie den Myelodysplastischen Syndromen (MDS) oder einer AML bereits als molekularer Marker definiert wurden. CHIP sind vor allem bei Patienten fortgeschrittenen Alters zu finden. Begründungen dafür liegen in der hohen Anzahl von Replikationen und der kumulativen Dosis an gentoxischen Einflüssen wie Strahlung und Zellgifte über ein langes Leben. Darüber hinaus kommt es mit fortschreitendem Alter zur Reduktion der hämatogenetisch aktiven Stammzellen.⁵⁶ Verschiedene Studien haben gezeigt, dass CHIP assoziierte Mutationen in < 1 % der Probanden unter 40 Jahre vorkommen, während in der Altersgruppe zwischen 71 und 80 Jahren zwischen 9,5 % und 13,9 % der Probanden entsprechende Mutationen aufwiesen.^{57–59} Überwiegend von Mutationen betroffen waren hier die Gene *TET2*, *DNMT3A* und *ASXL1*.^{57–59}

In CHIP liegen eine oder wenige dieser Mutationen in wenigen Zellen und damit geringer Allelfrequenz vor, ohne dass mit anderen diagnostischen Methoden eine Pathologie oder Malignität zu erkennen ist. Durch das Hinzukommen weiterer Mutationen innerhalb eines Zellklons können hämatologische Neoplasien entstehen. So vermag aus CHIP durch die Entwicklung eines Klons mit einer zweiten Mutation ein MDS und durch das Hinzukommen weiterer Mutationen eine AML entstehen. Abbildung 21 veranschaulicht die Entwicklung einer AML beispielhaft.

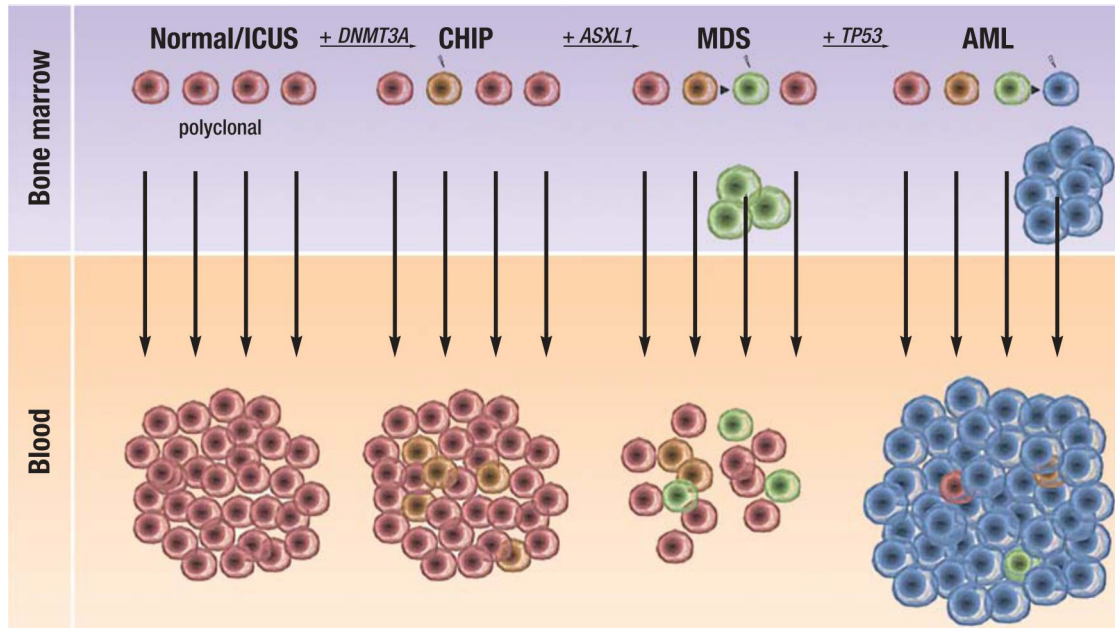


Abbildung 21 Beispiel der Entwicklung einer AML über die Stufen des CHIP und des MDS durch Entwicklung somatischer Mutationen. Die Auswahl der Mutationen ist beispielhaft.

Bildquelle: Heuser, Thol et al. 2016 - Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential⁵⁶

Jaiswal et al beschrieben, dass CHIP Träger mit Mutationen in den Genen *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* und *JAK2* neben dem Risiko der malignen Entartung auch ein nahezu verdoppeltes Risiko für das Auftreten einer Koronaren Herzerkrankung aufweisen.⁶⁰

Die komplexen Kombinationen von Aberrationen in CHIP können aktuell zeit- und kosteneffizient nur über NGS Methoden untersucht werden. Und auch für die tiefreichende Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Therapieentscheidungen bei MPN finden Methoden des NGS mit zunehmender Verfügbarkeit Anwendung im klinischen Alltag.⁶¹

5.5 Screening auf MPN bei abdominalen Venenthrombosen

Molekulargenetische Methoden finden auch bei der weiterführenden Diagnostik von Patienten mit abdominalen Venenthrombosen Anwendung. Eine Untersuchung auf *JAK2*, *MPL* und *CALR* bei abdominalen Venenthrombose kann schon vor Ausprägung weiterer Krankheitssymptome oder Blutbildveränderungen auf ein MPN hinweisen. Aufgrund hoher Prävalenzen von *JAK2* p.V617F empfohlen Smalberg et al 2012 ein Screening von Patienten mit abdominalen Venenthrombosen auf diese Mutation.³⁹ Selbige Metaanalyse

Diskussion

zeigte nur geringe Prävalenzen (< 1 %) für Mutationen im Exon 12 von *JAK2* sowie von *MPL* und beschrieb die Testung auf diese Mutationen als im klinischen Setting verzichtbar.³⁹ Die vorliegende Arbeit konnte bei 2 von 44 (4,5 %) Patienten mit stattgehabter abdominaler Venenthrombose eine Mutation mit niedriger Allelfrequenz für *MPL* nachweisen. Bei einem dieser Patienten fand sich zusätzlich eine *JAK2* p.V617F Mutation. Ohne molekularbiologische Analyse dieser Mutationen insbesondere im niedrigen Allelfrequenzbereich blieben diese unbemerkt. Als Konsequenz könnte sich ein verlängertes diagnostisches Intervall und verzögerter Therapiebeginn bei der Entwicklung eines manifesten MPN bzw. bei Progredienz der Erkrankung ergeben.

Eine Follow-up-Studie von Patienten mit stattgehabter abdominaler Venenthrombose ohne weitere Anzeichen eines MPN, jedoch nachgewiesener genetischer Aberration, konnte in vielen Fällen eine später aufgetretene MPN identifizieren.⁴⁹ Diese Daten unterstreichen die Bedeutung einer frühen und auch wiederholten molekulargenetischen Untersuchung dieser Patienten. Eine persistierende oder auch in Allelfrequenz progrediente Aberration kann sich so als Auslöser der abdominalen Venenthrombose demaskieren, mit einer daraus folgenden Therapiekonsequenz für den Patienten. In einer Studie an der Kopenhagener Allgemeinbevölkerung mit 49.488 Studienteilnehmern konnten 63 *JAK2* p.V617F Mutationen detektiert werden, beim Follow-up nach median 5,4 Jahren waren 48 der positiv getesteten Patienten verfügbar, unter diesen waren 22 bereits als MPN identifiziert, 18 weitere Patienten hatten zum zweiten Testzeitpunkt ein MPN entwickelt.⁴⁷

Während dieser Arbeit konnten bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen, die in die Studie eingeschlossen wurde, *JAK2* p.V617F Mutationen mit einer Prävalenz von 16,3 % detektiert werden, *MPL* W515 Mutationen konnten in 2/43 (4,5 %) mit niedriger Allelfrequenz nachgewiesen werden. Mutationen des *CALR* Gens wurden nicht detektiert. Debureau et al. veröffentlichten 2020 eine retrospektive Studie unter Einschluss von 80 Patienten mit abdominalen Venenthrombosen und MPN Diagnose, welche eine molekulargenetische Untersuchung mittels NGS erhielten. Etwa die Hälfte der Patienten wies zusätzliche Mutationen, hauptsächlich der Gene *DNMT3A*, *TET2* und *ASXL1*, auf.⁶² Bei Patienten mit zusätzlicher Mutation oder einer *JAK2*

Diskussion

p.V617F Allelfrequenz von über 50 % wurde ein schlechteres Langzeitergebnis im Hinblick auf hämatologische Transformation nachgewiesen.⁶² Die Anwendung von NGS Methoden in der klinischen Praxis ermöglicht so eine molekulare Klassifizierung und Prognoseeinschätzung für Patienten und vermag die klinische Entscheidungsfindung zu unterstützen sowie ein individualisiertes Therapieschema zu ermöglichen.⁶³

Die Patienten mit abdominalen Venenthrombosen der Prävalenzstudie präsentierten sich klinisch mit vielseitigen Symptomen. Daraus resultiert die Vorstellung bei unterschiedlichen medizinischen Fachdisziplinen. Die Assoziation von MPN mit abdominalen Venenthrombosen, aber auch genereller Thromboseneigung, ist außerhalb der Hämatologie und Onkologie nicht im Fokus. Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Empfehlung zur hämatologischen Spezialdiagnostik bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen. Neben abdominalen Venenthrombosen erleiden Patienten mit MPN und/oder *JAK2* p.V617F Mutationen unterschiedlichste Gefäßverschlüsse. Es finden sich beispielsweise Fallberichte zu aufgetretenen Koronararterienverschlüssen in jungen Patienten, als erste Manifestation eines MPN.^{64–66} Auch zerebrale Thrombosen in diesem Zusammenhang wurden beschrieben.⁶⁷ Sogar Kinder können von Thrombosen bei MPN und *JAK2*-Mutationen betroffen sein.⁶⁸ Zukünftige ähnliche Prävalenzstudien können zeigen, welche weiteren Gruppen von Patienten mit thromboembolischen Ereignissen dem Screening auf Mutation von *JAK2*, *MPL* und *CALR* unterzogen werden sollten.

5.6 Ausblick

Patienten mit einem Mutationsbefund wiesen gemäß der vorliegenden Angaben häufig keine weiteren Anzeichen für eine MPN auf. Ein Follow-up der Patienten in Bezug auf die Allelfrequenz der detektierten Mutation, Veränderungen im Blutbild oder Auftreten klinischer Symptome ist anzustreben und kann zu einem besseren Verständnis der Kinetik der Erkrankungen MPN und abdominale Venenthrombose führen.

Diskussion

Die Auswertung der 170 neben den Hotspot Mutationen detektierten Aberrationen könnte weitere Hinweise auf die molekulargenetische Komplexität geben und nutzt das gesamte Potential des entwickelten NGS Panels.

Auch Mutationen von *TET2*, *DNMT3A*, *EZH2* und *ASXL1* wurden im Zusammenhang mit abdominalen Venenthrombosen und vor allem dem Auftreten von hämatologischen Erkrankungen beschrieben. Die Prävalenz dieser Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen und ebenso unter den von uns auf *JAK2*, *MPL* und *CALR* untersuchten Proben könnte ein zukünftiges Forschungsvorhaben sein. Insbesondere für diese komplexen Untersuchungen ist die Methode des NGS besonders geeignet.

Einige Arbeiten konnten bereits molekulare Interaktionen zwischen abdominalen Venen und *JAK2* mutierten Leukozyten und Thrombozyten darstellen.²⁵ Der auf zellulärer Ebene ablaufende Prozess ist jedoch noch nicht vollends beschrieben und sollte ein weiteres Ziel folgender Untersuchungen sein. Welche Faktoren die Entstehung der abdominalen Venenthrombose bewirken ist bisher unzureichend verstanden. Abdominale Venenthrombosen sind ein komplikativer Symptomkomplex im Zusammenhang mit MPN. Ein besseres Verständnis in molekularer und zellulärer Hinsicht könnte dem Patienten in vielerlei Hinsicht helfen.

Im klinischen Alltag sollte das molekularbiologische Screening zur Abklärung einer jeden abdominalen Venenthrombose dazugehören. Das Erheben molekularbiologischer Befunde ist relevant für die weitere Betreuung des Patienten, Therapieentscheidungen und prognostische Aspekte. Inwieweit hier ein molekularbiologisches Monitoring im Verlauf (in Bezug auf Allelfrequenzen und weiterführende Mutationen) zur besseren Charakterisierung der MPN und ihrer Vorstufen und demzufolge zu gezielteren Therapiemaßnahmen beiträgt, kann am besten durch weitere prospektive Studien evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden wie das NGS ermöglichen die parallele Sequenzierung gesamter proteinkodierender Sequenzen, kompletten Genomen oder RNA Expressionsprofilen. Die Methode des NGS weist neben hoher Quantität der zu untersuchenden Genabschnitte auch eine sehr hohe Sensitivität auf. Abdominale Venenthrombosen sind ein seltenes Krankheitsbild und treten nicht selten als erste Manifestation eines MPN auf. Die Detektion von genetischen Veränderungen in den Genen von *JAK2*, *MPL* und *CALR* sind assoziiert mit MPN.

Im hämatologischen Speziallabor der Universitätsmedizin Rostock wurde ein NGS Panel zu Sequenzierung der gesamten proteinkodierenden Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* erstellt. Dieses NGS Panel fand anschließend im Rahmen einer Prävalenzstudie Anwendung: „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“.

Das NGS Panel konnte erfolgreich für hochsensitive Ansprüche validiert werden. In die Studie wurden zwischen Februar 2017 und Februar 2019 43 Patienten eingeschlossen. Die *JAK2* p.V617F Mutation konnte bei 7 von 43 (16,3 %) untersuchten Proben detektiert werden. Zudem konnten sechs Proben mit einer Allelfrequenz unter 2 % beschrieben werden, darunter vier *JAK2* p.V617F und zwei *MPL* p.W515K. Eine Probe wies zwei Mutationen auf (*JAK2* p.V617F mit einer Allelfrequenz > 2 %; *MPL* p.W515K < 2 %). Die durch den klinischen Fragebogen erfassten Daten zu Patientenanamnese, Charakterisierung der abdominalen Venenthrombosen und den Laborwerten zeigten eine große Varianz, ließen jedoch kaum Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Aberration erkennen.

7 Thesen

1. Mit ansteigender und kostengünstiger Verfügbarkeit werden Hochdurchsatzsequenzierungsmethoden wie das Next Generation Sequencing (NGS) zunehmend von Forschungsmethode zu klinischem Diagnostikum.
2. Myeloproliferative Neoplasien (MPN) stellen ein komplexes Krankheitsbild, deren erstes Symptom nicht selten eine abdominelle Venenthrombose ist.
3. Die am häufigsten mit MPN assoziierten Mutationen finden sich in den Genen *JAK2*, *MPL* und *CALR*. Sie werden standardmäßig durch hochsensitive qPCR der Hotspot Regionen (Genloci mit hoher Mutationssequenz) nachgewiesen. Weitere Regionen dieser Gene können von Bedeutung sein. Eine geeignete Nachweismethode stellt das NGS dar.
4. Für die molekulare Diagnostik der MPN in Bezug auf die genannten Gene wurde ein Primerpanel für NGS zusammengestellt, welches es ermöglicht die gesamte proteinkodierende Sequenz der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* während einer Untersuchung zu sequenzieren.
5. Das etablierte Panel deckt die kritischen Hotspots der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* jeweils mit 2 Amplikons ab.
6. Die Sensitivität des NGS wird in der Regel mit einem Cut off von 5 % - 2 % beschrieben. Das evaluierte Panel zeigt eine hochsensitive Spezifität auch unter der konventionellen 5 % - 2 % Detektionsgrenze.
7. Abdominelle Venenthrombosen sind seltene, aber oft klinisch schwerwiegende Ereignisse, für die unterschiedliche Ursachen beschrieben sind. Um ihr Auftreten im Zusammenhang mit MPN im Bundesland Mecklenburg-Vorpommern zu untersuchen wurde die Studie „Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ initiiert.
8. Von Februar 2017 bis Februar 2019 wurden im Rahmen der Studie 43 Patientenproben analysiert.
9. Die Prävalenz von *JAK2*-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen in Mecklenburg-Vorpommern im Rahmen der Studie

Thesen

- lag bei 16,3 %, wurde der konventionelle Cut off (mit einer Allelfrequenz ≥ 2 %) angewendet.
10. Die Anwendung hochsensitiver Sequenzierung führte zur Erhöhung der Prävalenz von Punktmutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen für *JAK2* von 16,3 % auf 25,6 %. Durch die Hinzunahme von *MPL* Mutationen zeigte sich eine Prävalenz der Gesamtaberrationen an den Hotspot-Regionen von 30,2 %.
 11. Das Auftreten von abdominalen Venenthrombosen korreliert nicht mit Allelfrequenzen vorhandener Mutationen.
 12. Zur weiteren Absicherung hochsensitiver Sequenzierergebnisse ist der Einsatz von unique molecular identifiers (UMI) – eine einmalige Barcodemarkierung der Ausgangs-DNA vor der ersten Vervielfältigung (PCR) – denkbar.
 13. Die Angaben zur Lokalisation der Thrombose und zur klinischen Präsentation zeigten sich unabhängig von Mutationsstatus vielfältig und ließen keine Hinweise auf MPN zu.
 14. Blutbildveränderungen bei den eingeschlossenen Patienten waren variabel und erlaubten keine Unterscheidung von Patienten mit nachgewiesener Hotspot Mutation von Patienten mit abdominaler Venenthrombose anderer Genese.
 15. Die molekulargenetische Diagnostik ist bei der Identifikation von MPN ein wichtiger Bestandteil. Neben den Hotspot Mutationen der Gene *JAK2*, *MPL* und *CALR* werden zunehmend weitere Mutationen auch in weiteren Genen beschrieben. Nur die Methode des NGS ermöglicht eine hochsensitive Sequenzierung, vieler Gen und Genabschnitte, zeit- und kosteneffizient

8 Literaturverzeichnis

- 1 Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, Long N, Schultz AR, Traer E, Abel M, Agarwal A, Blucher A, Borate U, Bryant J, Burke R, Carlos A, Carpenter R, Carroll J, Chang BH, Coblenz C, d'Almeida A, Cook R, Danilov A, Dao K-HT, Degnin M, Devine D, Dibb J, Edwards DK, Eide CA, English I, Glover J, Henson R, Ho H, Jemal A, Johnson K, Johnson R, Junio B, Kaempf A, Leonard J, Lin C, Liu SQ, Lo P, Loriaux MM, Luty S, Macey T, MacManiman J, Martinez J, Mori M, Nelson D, Nichols C, Peters J, Ramsdill J, Rofelty A, Schuff R, Searles R, Segerdell E, Smith RL, Spurgeon SE, Sweeney T, Thapa A, Visser C, Wagner J, Watanabe-Smith K, Werth K, Wolf J, White L, Yates A, Zhang H, Cogle CR, Collins RH, Connolly DC, Deininger MW, Drusbosky L, Hourigan CS, Jordan CT, Kropf P, Lin TL, Martinez ME, Medeiros BC, Pallapati RR, Pollyea DA, Swords RT, Watts JM, Weir SJ, Wiest DL, Winters RM, McWeeney SK, Druker BJ. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* 2018; 562: 526–531.
- 2 Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, Longtine JA, Sabath D, Wang YL. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2013; 15: 733–744.
- 3 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391–2405.
- 4 Spiekermann TM□K (Hrsg. 2015). Leukämien, myelodysplastische Syndrome und myeloproliferative Neoplasien. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 4. Aufl. Zuckschwerdt Verlag, s.l., 2015.
- 5 O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annual review of medicine* 2015; 66: 311–328.

Literaturverzeichnis

- 6 Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjan Y, Young C, Jensen ON, Xu C-F, Neubert TA, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nature structural & molecular biology* 2011; 18: 971–976.
- 7 Kralovics Robert, Passamonti Francesco, Buser Andreas S., Teo Soon-Siong, Tiedt Ralph, Passweg Jakob R., Tichelli Andre, Cazzola Mario, Skoda Radek C. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders.
- 8 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
- 9 Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell* 2005; 7: 387–397.
- 10 Lin Y, Liu E, Sun Q, Ma J, Li Q, Cao Z, Wang J, Jia Y, Zhang H, Song Z, Ai X, Shi L, Feng X, Li C, Wang J, Ru K. The Prevalence of JAK2, MPL, and CALR Mutations in Chinese Patients With BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2015; 144: 165–171.
- 11 Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *American journal of hematology* 2011; 86: 668–676.
- 12 Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, van Duyn LB, Greives MR, Naylor S-M, Michalak M, Murphy-Ullrich JE. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; 24: 665–683.
- 13 Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F,

Literaturverzeichnis

- Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 2379–2390.
- 14 Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du M-Q, Greaves M, Bowen D, Huntly BJP, Harrison CN, Cross NCP, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 2391–2405.
- 15 Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *International journal of hematology* 2017; 105: 743–747.
- 16 Stefano V de, Za T, Ciminello A, Betti S, Rossi E. Causes of adult splanchnic vein thrombosis in the mediterranean area. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2011; 3: e2011063.
- 17 Rajani R, Melin T, Björnsson E, Broomé U, Sangfelt P, Danielsson A, Gustavsson A, Grip O, Svensson H, Löf L, Wallerstedt S, Almer SHC. Budd-Chiari syndrome in Sweden: epidemiology, clinical characteristics and survival - an 18-year experience. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2009; 29: 253–259.
- 18 Rajani R, Björnsson E, Bergquist A, Danielsson A, Gustavsson A, Grip O, Melin T, Sangfelt P, Wallerstedt S, Almer S. The epidemiology and clinical features of portal vein thrombosis: a multicentre study. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2010; 32: 1154–1162.
- 19 Acosta S, Alhadad A, Svensson P, Ekberg O. Epidemiology, risk and prognostic factors in mesenteric venous thrombosis. *The British journal of surgery* 2008; 95: 1245–1251.

Literaturverzeichnis

- 20 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research* 1996; 6: 986–994.
- 21 Thermo Fisher Scientific, 16 February 2018. Ion Sphere Quality Control Kit User Guide (Pub. No. MAN0017531 Rev. A.0).
- 22 Maslah N, Verger E, Schlageter M-H, Miclea J-M, Kiladjian J-J, Giraudier S, Chomienne C, Cassinat B. Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Annals of hematology* 2019; 98: 111–118.
- 23 Wu S, Luo P, Yu Y, Xiong B, Wang Y, Zuo X. Next-generation sequencing redefines the diagnosis of triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2021.
- 24 Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome research* 2017; 27: 491–499.
- 25 Aird WC. Vascular bed-specific thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2007; 5 Suppl 1: 283–291.
- 26 Smalberg JH, Kruij MJHA, Janssen HLA, Rijken DC, Leebeek FWG, Maat MPM de. Hypercoagulability and hypofibrinolysis and risk of deep vein thrombosis and splanchnic vein thrombosis: similarities and differences. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2011; 31: 485–493.
- 27 How J, Zhou A, Oh ST. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: pathophysiology and molecular mechanisms of disease. *Therapeutic advances in hematology* 2017; 8: 107–118.
- 28 Colaizzo D, Tiscia GL, Pisanelli D, Bafunno V, Amitrano L, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M. New TET2 gene mutations in patients with myeloproliferative neoplasms and splanchnic vein thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2010; 8: 1142–1144.
- 29 Jang MA, Seo MY, Choi KJ, Hong DS. A Rare Case of Essential Thrombocythemia with Coexisting JAK2 and MPL Driver Mutations. *Journal of Korean medical science* 2020; 35: e168.
- 30 Makarik TV, Abdullaev AO, Nikulina EE, Treglazova SA, Stepanova EE, Subortseva IN, Kovrigina AM, Melikyan AL, Kulikov SM, Sudarikov AB. Low JAK2 V617F Allele Burden in Ph-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms Is Associated with Additional CALR or MPL Gene Mutations. *Genes* 2021; 12: 559.

Literaturverzeichnis

- 31 Haslam K, Langabeer SE. Incidence of CALR mutations in patients with splanchnic vein thrombosis. *British Journal of Haematology* 2015; 168: 459–460.
- 32 Turon F, Cervantes F, Colomer D, Baiges A, Hernández-Gea V, Garcia-Pagán JC. Role of calreticulin mutations in the aetiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *Journal of hepatology* 2015; 62: 72–74.
- 33 Brito M, Nunes G, Laranjo A, Sabino J, Oliveira C, Valle S, Gonçalves D, Fonseca J. A unique case of bleeding from esophageal varices as the first sign of essential thrombocythemia. *Clin J Gastroenterol* 2021: 1–5.
- 34 Yoo E-H, Jang J-H, Park K-J, Gwak G-Y, Kim H-J, Kim S-H, Kim D-K. Prevalence of overt myeloproliferative neoplasms and JAK2 V617F mutation in Korean patients with splanchnic vein thrombosis. *International journal of laboratory hematology* 2011; 33: 471–476.
- 35 Tondeur S, Boutruche S, Biron-Andréani C, Schved J-F. Prevalence of the JAK2 V617F mutation associated with splanchnic vein thrombosis. A 10-year retrospective study. *Thrombosis and haemostasis* 2009; 101: 787–789.
- 36 Basquiera AL, Tabares AH, Soria N, Salguero M, Ryser R, García JJ. Prevalence of Janus Kinase 2 mutations in patients with unusual site venous thrombosis. *Medicina* 2011; 71: 313–316.
- 37 Stefano V de, Vannucchi AM, Ruggeri M, Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Iurlo A, Randi ML, Pieri L, Rossi E, Guglielmelli P, Betti S, Elli E, Finazzi MC, Finazzi G, Zetterberg E, Vianelli N, Gaidano G, Nichele I, Cattaneo D, Palova M, Ellis MH, Cacciola E, Tieghi A, Hernandez-Boluda JC, Pungolino E, Specchia G, Rapezzi D, Forcina A, Musolino C, Carobbio A, Griesshammer M, Barbui T. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients. *Blood cancer journal* 2016; 6: e493.
- 38 Kiladjian J-J, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, Cazals-Hatem D, Plessier A, Garcia-Pagan J-C, Darwish Murad S, Raffa S, Janssen HLA, Gardin C, Cereja S, Tonetti C, Giraudier S, Condat B, Casadevall N, Fenaux P, Valla DC. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 2008; 111: 4922–4929.

Literaturverzeichnis

- 39 Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, Kiladjian J-J, Janssen HLA, Leebeek FWG. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2012; 120: 4921–4928.
- 40 Colaizzo D, Tiscia GL, Bafunno V, Amitrano L, Vergura P, Lupone MR, Grandone E, Guardascione MA, Margaglione M. Sex modulation of the occurrence of jak2 v617f mutation in patients with splanchnic venous thrombosis. *Thrombosis research* 2011; 128: 233–236.
- 41 Stein BL, Williams DM, Wang N-Y, Rogers O, Isaacs MA, Pemmaraju N, Spivak JL, Moliterno AR. Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2010; 95: 1090–1097.
- 42 Stein BL, Rademaker A, Spivak JL, Moliterno AR. Gender and Vascular Complications in the JAK2 V617F-Positive Myeloproliferative Neoplasms. *Thrombosis* 2011; 2011: 874146.
- 43 Sant'Antonio E, Guglielmelli P, Pieri L, Primignani M, Randi ML, Santarossa C, Rumi E, Cervantes F, Delaini F, Carobbio A, Betti S, Rossi E, Lavi N, Harrison CN, Curto-Garcia N, Gisslinger H, Gisslinger B, Specchia G, Ricco A, Vianelli N, Polverelli N, Koren-Michowitz M, Ruggeri M, Girodon F, Ellis M, Iurlo A, Mannelli F, Mannelli L, Sordi B, Loscocco GG, Cazzola M, Stefano V de, Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM. Splanchnic vein thromboses associated with myeloproliferative neoplasms: An international, retrospective study on 518 cases. *American journal of hematology* 2020; 95: 156–166.
- 44 Wautier J-L, Wautier M-P. Molecular basis of erythrocyte adhesion to endothelial cells in diseases. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2013; 53: 11–21.
- 45 Matsuura S, Thompson CR, Belghasem ME, Bekendam RH, Piasecki A, Leiva O, Ray A, Italiano J, Yang M, Merrill-Skoloff G, Chitalia VC, Flaumenhaft R, Ravid K. Platelet Dysfunction and Thrombosis in JAK2V617F-Mutated Primary Myelofibrotic Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2020; 40: e262-72.
- 46 Eaton N, Subramaniam S, Schulte ML, Drew C, Jakab D, Haberichter SL, Weiler H, Falet H. Bleeding diathesis in mice lacking JAK2 in platelets. *Blood advances* 2021; 5: 2969–2981.

Literaturverzeichnis

- 47 Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica* 2014; 99: 1448–1455.
- 48 How J, Trinkaus KM, Oh ST. Distinct clinical, laboratory and molecular features of myeloproliferative neoplasm patients with splanchnic vein thrombosis. *British Journal of Haematology* 2018; 183: 310–313.
- 49 Colaizzo D, Amitrano L, Guardascione MA, Tiscia GL, D'Andrea G, Longo VAC, Grandone E, Margaglione M. Outcome of patients with splanchnic venous thrombosis presenting without overt MPN: a role for the JAK2 V617F mutation re-evaluation. *Thrombosis research* 2013; 132: e99-e104.
- 50 Tefferi A, Pardanani A, Lim K-H, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li C-Y, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009; 23: 905–911.
- 51 Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. *Cells* 2019; 8.
- 52 Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NCP. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics* 2009; 41: 446–449.
- 53 Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics* 2009; 41: 450–454.
- 54 Smalberg JH, Koehler E, Darwish Murad S, Plessier A, Seijo S, Trebicka J, Primignani M, Maat MPM de, Garcia-Pagan J-C, Valla DC, Janssen HLA, Leebeek FWG. The JAK2 46/1 haplotype in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis. *Blood* 2011; 117: 3968–3973.
- 55 Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood* 2015; 126: 9–16.
- 56 Heuser M, Thol F, Ganser A. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. *Deutsches Arzteblatt international* 2016; 113: 317–322.

Literaturverzeichnis

- 57 Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoun SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 2477–2487.
- 58 Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 2488–2498.
- 59 Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dpersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature medicine* 2014; 20: 1472–1478.
- 60 Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, Baber U, Mehran R, Fuster V, Danesh J, Frossard P, Saleheen D, Melander O, Sukhova GK, Neuberg D, Libby P, Kathiresan S, Ebert BL. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *The New England journal of medicine* 2017; 377: 111–121.
- 61 Palumbo GA, Stella S, Pennisi MS, Piroso C, Fermo E, Fabris S, Cattaneo D, Iurlo A. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Frontiers in Oncology* 2019; 9.
- 62 Debureau P-E, Cassinat B, Soret-Dulphy J, Mora B, Verger E, Maslah N, Plessier A, Rautou P-E, Ollivier-Hourman I, Ledinghen V de, Gorla O, Bureau C, Siracusa C, Valla D, Giraudier S, Passamonti F, Kiladjian J-J. Molecular profiling and risk classification of patients with myeloproliferative neoplasms and splanchnic vein thromboses. *Blood advances* 2020; 4: 3708–3715.

Literaturverzeichnis

- 63 Skov V. Next Generation Sequencing in MPNs. Lessons from the Past and Prospects for Use as Predictors of Prognosis and Treatment Responses. *Cancers* 2020; 12.
- 64 Sharma P, Gupta S, Patel P, Zhang Y, Peles S. Acute ST-segment Elevation Myocardial Infarction as the First Manifestation of Essential Thrombocytosis. *Cureus* 2019; 11: e4032.
- 65 Gao W, Shen W, Luo X, Shi H, Jiang X, Pan J. ST-segment elevation myocardial infarction in patient with essential thrombocythemia without associated risk. *International journal of cardiology* 2015; 180: 223–225.
- 66 Khareshi I, Memaryan M, Taherkhani M, Serati A, Movahed MR. Acute ST-segment elevation myocardial infarction as the first manifestation of essential thrombocytosis successfully treated with thrombectomy alone. *Cardiovascular intervention and therapeutics* 2016; 31: 275–278.
- 67 Riva N, Ageno W. Approach to thrombosis at unusual sites: Splanchnic and cerebral vein thrombosis. *Vascular medicine (London, England)* 2017; 22: 529–540.
- 68 Tafesh L, Musgrave K, Roberts W, Plews D, Carey P, Biss T. Myeloproliferative Neoplasms in Children and Adolescents and Thrombosis at Unusual Sites: The Role of Driver Mutations. *Journal of pediatric hematology/oncology* 2019; 41: 490–493.

9 Anhang

9.1 Flyer zur Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ in Mecklenburg-Vorpommern

Probeneinsendung



- **Blutröhrchen des Patienten**
(5 ml EDTA-Blut, beschriftet mit den Patienteninitialen und dem Geburtsdatum)
- **klinischer Fragebogen**
- **unterschiedene Einverständniserklärung des Patienten**

an:
Mildred Scheel Labor
Medizinische Klinik III
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an:
Hämatologisches Speziallabor:
☎ 0381-494 7519
Wissenschaftliche Leitung:
Dr. rer. nat. Catrin Roolf
✉ catrin.roolf@med.uni-rostock.de
PD Dr. rer. nat. Hugo Murua Escobar
✉ hugo.murua.escobar@med.uni-rostock.de
Ärztliche Leitung:
☎ Sekretariat: 0381-494 7459
OÄ Dr. med. Christina Große-Thie
✉ christina.grosse-thie@med.uni-rostock.de
OÄ Dr. med. Larissa Henze
✉ larissa.henze@med.uni-rostock.de

Universitätsmedizin Rostock
rechtsfähige Teilkörperschaft der Universität Rostock

Universität
Rostock

Universitätsmedizin
Rostock

**Zentrum für Innere Medizin,
Medizinische Klinik III
Klinik für Hämatologie, Onkologie und
Palliativmedizin**



Informationsbroschüre

**Prävalenz von JAK2-Mutationen
bei Patienten mit abdominalen
Venenthrombosen**

www.med.uni-rostock.de

*Gefördert durch die
Gesellschaft der Internisten
Mecklenburg-Vorpommern e. V.*





Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III
Klinik für Hämatologie,
Onkologie und Palliativmedizin

Direktor
Prof. Dr. med. Christian Junghansß
christian.junghanss@med.uni-rostock.de

Sitz: Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Telefon: +49 381 494-7421
Telefax: +49 381 494-7422

Rostock, den 18.05.2017

„Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“

Sehr geehrte Kollegin, sehr geehrter Kollege,

bitte füllen Sie den klinischen Fragebogen zur o. g. Studie möglichst vollständig aus.

Sie werden dafür nur einige Minuten benötigen.

Senden Sie den **klinischen Fragebogen** mit dem **Blutröhrchen des Patienten (5 ml EDTA-Blut, beschriftet mit den Patienteninitialen und dem Geburtsdatum)** und der **unterschiedenen Einverständniserklärung des Patienten** an folgende Adresse:

Mildred Scheel Labor
Medizinische Klinik III
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Proben können während der ganzen Woche eingesendet werden. Bei Versendung an einem Freitag bitte telefonische Anmeldung.

Bei Rückfragen stehen wir gerne zur Verfügung:


Tel: 0381-494 7459 (OA Sekretariat) oder 0381-494 7519 (Labor, PD Hugo Murua Escobar)

email: christina.grosse-thie@med.uni-rostock.de
larissa.henze@med.uni-rostock.de
catrin.roolf@med.uni-rostock.de
hugo.murua.escobar@med.uni-rostock.de

Wir danken für Ihre Mitarbeit an dem Forschungsprojekt.

Mit freundlichen Grüßen


OÄ Dr. med. C. Große-Thie


OÄ Dr. med. L. Henze

Gefördert durch die Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommern e.V.



Universitätsmedizin Rostock – rechtsfähige Teilkörperschaft der Universität Rostock
Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Christian Schmidt MPH · Aufsichtsratsvorsitzender: Sebastian Schröder
USI-IdNr: DE 246 101 670 · Bankverbindung: Deutsche Bundesbank · IBAN: DE1613000000013001531 · BIC: MARKDEF1130
www.med.uni-rostock.de



Klinischer Fragebogen zur Studie: „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“				
Initialen des Patienten: <small>(1. Buchstabe des Vor- und Nachnamens)</small>		Geburtsdatum:		
Geschlecht:	<input type="checkbox"/> männlich	<input type="checkbox"/> weiblich		
Klinische Beschwerden?				
Venöse Thrombosen abdominell				
Pfortader:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Lebervenen:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Milzvene:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Mesenterialvenen:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Andere Venen:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	Welche?
Wie diagnostiziert?	<input type="checkbox"/> Sonografie	<input type="checkbox"/> CT	<input type="checkbox"/> MRT	<input type="checkbox"/> OP
Wann diagnostiziert?	Datum:			
Therapie?	<input type="checkbox"/> OP	<input type="checkbox"/> Antikoagulation, welche?		
Hepatomegalie: <small>(klinisch beurteilt)</small>	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Splenomegalie: <small>(klinisch beurteilt)</small>	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Leukozyten:	GPT/l			
Hb:	mmol/l		g/dl	
Thrombozyten:	GPT/l			
LDH:	U/l			
Z.n. Thromboembolie:	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	
Bekannte Thrombophilie: <small>(z.B. Faktor V Mutation)</small>	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	Welche?
Tumorerkrankung?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	Welche?
Leberzirrhose ?	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein	<input type="checkbox"/> nicht bekannt	

Datum der Blutentnahme:	
Stempel der Klinik/Praxis	

Wird bei Probeneingang ausgefüllt	
Datum des Probeneingangs:	
Einverständniserklärung:	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Zustimmung zur Befundübermittlung:	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Bearbeitungsnummer:	

Gefördert durch die Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommern e. V.



Universitätsmedizin Rostock – rechtsfähige Teilkörperschaft der Universität Rostock
 Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Christian Schmidt MPH · Aufsichtsratsvorsitzender: Sebastian Schröder
 USt-IdNr: DE 246 101 670 · Bankverbindung: Deutsche Bundesbank · IBAN: DE1613000000013001531 · BIC: MARKDEF1130
 www.med.uni-rostock.de



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III –
Klinik für Hämatologie,
Onkologie und Palliativmedizin

Direktor
Prof. Dr. med. Christian Junghans
christian.junghans@med.uni-rostock.de

Sitz: Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Telefon: +49 381 494-7421

Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Ihr behandelnder Arzt hat bei Ihnen ein Blutgerinnsel (Thrombose) in einem Gefäß des Bauchraumes festgestellt. Die Ursachen eines solchen Gerinnsels können sehr vielfältig sein. Neben Faktoren, die die Gerinnbarkeit des Blutes beeinflussen, spielen Medikamente, erbliche Faktoren und Gefäßwandveränderungen eine Rolle. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass derartige Gerinnsel mit Veränderungen von Eiweißen auf genetischer Ebene einhergehen.

Im Rahmen eines Forschungsprojektes, welches wir an der Universitätsmedizin Rostock durchführen („**Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen**“), soll nun die Häufigkeit derartiger genetischer Eiweißveränderungen bei Patienten mit Ihrer Erkrankung untersucht werden.

Zur Untersuchung wird eine kleine Menge Blut (5 ml) benötigt, welche im Rahmen einer ohnehin erforderlichen Blutentnahme gewonnen werden kann. Dabei ist es unerheblich, ob das Blutgerinnsel gerade erst oder schon vor längerer Zeit diagnostiziert wurde.

Die Untersuchung des Blutes erfolgt auf genetische Veränderungen (JAK2-Mutation und ggf. weitere) und nur zu Forschungszwecken. Ihre Daten werden dabei anonymisiert, das heißt ohne Übermittlung Ihres Namens, verarbeitet. Wenn gewünscht, erhält Ihr Arzt von uns eine Rückmeldung über das Untersuchungsergebnis. Zur besseren Einordnung der Befunde bitten wir Ihren behandelnden Arzt um einige zusätzliche Angaben, z.B. welche Beschwerden Sie zum Arzt geführt haben, wo das Blutgerinnsel gefunden wurde, welche Vorerkrankungen bei Ihnen bestehen.

Mit diesem Forschungsprojekt, welches von der **Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommern e. V.** unterstützt wird, erhoffen wir uns weitere Erkenntnisse zur Entstehung derartiger Gerinnsel und zugrundeliegender Erkrankungen.

Wir bitten Sie daher um Ihre Mitarbeit.

Die Teilnahme an diesem Projekt ist selbstverständlich freiwillig, kostenlos für Sie und kann jederzeit durch Sie ohne Angabe von Gründen widerrufen werden.

Wir bedanken uns für Ihre Mitarbeit sehr herzlich!

Das Studienteam

OÄ Dr.med. C. Große-Thie

OÄ Dr.med. L. Henze

PD Dr.rer.nat. H. Murua Escobar

Dr.rer.nat. C. Roof

Universitätsmedizin Rostock – rechtsfähige Teilkörperschaft der Universität Rostock
Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Christian Schmidt MPH · Aufsichtsratsvorsitzender: Sebastian Schröder
USI-IdNr. DE 246 101 670 · Bankverbindung: Deutsche Bundesbank · IBAN: DE1613000000013001531 · BIC: MARKDEF1130
www.med.uni-rostock.de



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Mildred Scheel Labor
Medizinische Klinik III –
Klinik für Hämatologie, Onkologie und
Palliativmedizin

Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik III –
Klinik für Hämatologie,
Onkologie und Palliativmedizin

Direktor
Prof. Dr. med. Christian Junghansß
christian.junghanss@med.uni-rostock.de

Sitz: Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Telefon: +49 381 494-7421
Telefax: +49 381 494-7422

Einverständniserklärung der Patientin/des Patienten zur Teilnahme an der Studie:
„Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“
(gefördert durch die Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommern e.V.)

Ich bin einverstanden, an der Studie mit oben genanntem Titel teilzunehmen.

Die Studienleitung erfolgt durch die Medizinische Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universitätsmedizin Rostock, Ernst-Heydemann-Str. 6, 18057 Rostock, Tel.: 0381-494-7459

Studienleiter: OÄ Dr. med. C. Große-Thie, OÄ Dr. med. L. Henze

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten in verschlüsselter (anonymisierter) Form gespeichert und zu Forschungszwecken verwendet werden.

Ich erkläre hiermit die freiwillige Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben.

Ich wünsche, dass meinem behandelnden Arzt das Ergebnis der Untersuchung mitgeteilt wird.

Name des Patienten in Druckschrift: _____

Ort, Datum: _____

Unterschrift des Patienten: _____

Name des aufklärenden Arztes in Druckschrift: _____

Ort, Datum: _____

Unterschrift des Arztes: _____

Stempel der Klinik/Praxis mit Anschrift: _____

B E F U N D B E R I C H T:

Mikroskopische Leukozytendifferenzierung

Bearbeitungsnummer: MPN 38

Untersuchungsgut: pB EDTA

Untersuchungsgutentnahme: 03.12.2018

Untersuchungsguteingang: 03.12.2018

Befunddatum: 08.02.2019

Zur Beurteilung liegen zwei periphere Blutausstriche, gefärbt nach Pappenheim, guter Qualität vor.

Leukozyten:

Anzahl vermehrt

Differenzierung der Leukozyten, relative Anzahl in %

Lymphozyten	41%
Atypische Lymphozyten	0%
Kernschatten	0%
Plasmazellen	0%
Monozyten	0%
Eosinophile	0%
Basophile	2%
Segmentkernige Neutrophile	25%
Stabkernige Neutrophile	22%
Metamyelozyten	10%
Myelozyten	0%
Promyelozyten	0%
Blasten	0%
Sonstige	0%

Anhang

Besonderheiten in der Zellmorphologie:

Differenziert wurden 100 Zellen.

Erythrozyten:

Die Erythrozyten erscheinen stark hyperchrom und mikrozytär, sie weisen eine deutliche Anisozytose auf. Im Präparat sind häufig Normoblasten aufzufinden. Desweiteren ist eine Poikilozytose und das Vorkommen von basophilen Tüpfelungen, sowie Stechapfelformen auffällig.

Thrombozyten:

Die Anzahl der Thrombozyten im vorliegenden Präparat ist deutlich vermindert. Es finden sich Riesenthrombozyten.

Beurteilung:

Die Leukozyten zeigen ein Differentialblutbild mit starker Linksverschiebung. Das Vorkommen von Normoblasten deutet auf eine Extramedulläre Blutbildung hin. Diese Veränderungen, wie gleichfalls die Verringerung der Thrombozytenzahl, lässt sich mit der Diagnose einer Myeloproliferativen Neoplasie in Einklang bringen. Die Detektion einer hohen Allellast der *JAK2* p.V617F Mutation unterstützt dies.

OÄ Dr. med. L. Henze

Luise Grunwald

Anhang

9.7 Beispiel: NGS Befund



Universitätsmedizin Rostock · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Universitätsmedizin Rostock
KIM Abteilung Gastroenterologie
Station 5

-im Hause-

31.08.2018

**Zentrum für Innere
Medizin**
Medizinische Klinik III –
Klinik für Hämatologie,
Onkologie,
Palliativmedizin

Direktor
Prof. Dr. med. Christian
Junghanß
Tel.: +49 381 494-7420

**Hämatologisches
Speziallabor:**
Prof. Dr. med. S. Böttcher
PD Dr. rer. nat. H. Murua
Escobar

Sitz:
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

Telefon Labor: +49 381
494-7437
Telefax: +49 381 494-7532

BEFUNDBERICHT:

Mutationsanalyse mittels NGS (Next Generation Sequencing)

Patient:

Geburtsdatum:

Untersuchungsguteingang: 09.08.2018

Untersuchungsgutnummer: NP399 / MPN30

Untersuchungsgutanalyse: 30.08.2018

Untersuchungsgut: pB EDTA

Beurteilung des UG: geeignet für DNA Isolation

Indikation/Fragestellung: JAK2 im Rahmen der Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“

NGS-Panel: MPN Panel (Minimalabdeckung 500reads)

Anhang

Ergebnis:

Gen	Status	Referenztranskript	HGVS	Allellast
JAK2 V617F	positiv, p.V617F, COSM12600	NM_004972.3	c.1849G>T	24,6%
JAK2 L611V, V617F (COSM25834)	negativ			
JAK2 C618R, D620E	negativ			
JAK2 Exon 12	negativ			

Beurteilung:

Beurteilung spezifisch:

Von der isolierten DNA für die Probe NP399 / MPN30 wurde eine Mutationsanalyse mittels NGS durchgeführt. Die untersuchte Probe wies für JAK2 V617F (COSM12600) einen Austausch von G nach T (heterozygot; Allelfrequenz 24,6%) auf. Die untersuchte Probe wies keine Jak2 Mutationen für p.L611V (COSM51411), p.V617F (COSM25834; c.1848_1849TG>CT), p.C618R (COSM29118) und p.D620E (COSM27063) auf.

Details zu den im Panel untersuchten Genbereichen finden sich in der Tabelle Anhang 1. Sensitivität NGS Analyse 2%.

Beurteilung Methoden/Testverfahren:

Gen	Amplikonabdeckung in Sequenzreads (Ziel: 500 Sequenzreads)	Sequenziertiefe in Sequenzreads (Ziel: 500 Sequenzreads)
JAK2	≥3.903	11.742

Prof. Dr. med. habil. C. Junghanß

PD Dr. rer. nat. habil. H. Murua Escobar

Prof. Dr. med. habil. S. Böttcher

Anhang 1: untersuchte Genbereiche:

Gen	gescreenter Bereich
MPL	Protein kodierende Sequenz
CALR	Protein kodierende Sequenz
JAK2	Protein kodierende Sequenz

10 Danksagung

Schließlich möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen. All' denjenigen, die mich unterstützt, angeleitet und begleitet haben.

Prof. Dr. med. Christian Junghanß danke ich für das Thema und den damit verbundenen Vertrauensvorschuss zu Beginn der Arbeit.

Frau Dr. med. Henze danke ich für die Ermutigung und Unterstützung sowie die andauernde Hilfe bei jedem Problem. Ein großes „¡Gracias!“ an PD Dr. rer. nat. habil. Hugo Murua Escobar, weil ich mir eine nettere Atmosphäre und bessere Anleitung, während meiner Arbeit und bei meinen Betreuern nicht hätte wünschen können.

Ich bedanke mich bei den Mitinitiatoren der Studie „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“: Dr. med Christina Große-Thie und Dr. rer. nat Catrin Roof sowie bei der Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommerns e.V. für die erhaltene Förderung.

Ein besonderer Dank geht an alle Patientinnen und Patienten sowie Ärztinnen und Ärzte ohne deren Aufmerksamkeit, Motivation und Zeit meine Arbeit an dieser Studie nicht möglich gewesen wäre.

Dipl.-Biol. Saskia Krohn und Gudrun Knübel danke ich für die bedingungslose Aufnahme in das eingeschworene Team des Haema-Speziallabors, für die große Hilfe mit meiner Arbeit und besonders auch für die netten Gespräche und Hilfen bei großen und kleinen theoretischen Problemen des Alltags und des Lebens.

Meinen Eltern Anke und Matthias Grunwald für ihren Glauben an mich.

Dipl.-Med. Heidrun Körk für ihre bedingungslose und ständige Unterstützung.

Max und Verena: Danke, ihr habt es überstanden!

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Etablierung und Anwendung eines NGS Panels zur Detektion von genetischen Varianten der Gene JAK2, MPL und CALR Hochdurchsatzscreening im Rahmen der Studie: „Prävalenz von JAK2-Mutationen bei Patienten mit abdominalen Venenthrombosen“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)