

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Differentielle Modulation der Funktion neutrophiler Granulozyten durch Ruxolitinib in  
Myeloproliferativen Neoplasien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Julia Katharina Simon  
Aus Wadern

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: ...

1. Gutachter: ...

2. Gutachter: ...

Tag der Promotion: 30.06.2023



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation .....	1
2 Literaturdiskussion .....	3
2.1 Myeloproliferative Neoplasien .....	3
2.1.1 Definition.....	3
2.1.2 Epidemiologie .....	3
2.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	4
2.1.3.1 BCR-ABL1-Mutation.....	4
2.1.3.2 JAK-Mutation.....	5
2.1.3.3 MPL-Mutationen.....	6
2.1.3.4 CALR-Mutationen.....	7
2.1.3.5 Weitere Mutationen .....	7
2.1.3.6 Inflammation.....	9
2.1.4 WHO-Klassifikation.....	12
2.1.5 Chronisch myeloische Leukämie .....	12
2.1.5.1 Klinik .....	13
2.1.5.2 Diagnose .....	13
2.1.5.3 Risikostratifikation .....	16
2.1.6 Polyzythaemia vera .....	16
2.1.6.1 Klinik .....	16
2.1.6.2 Diagnose .....	17
2.1.6.3 Risikostratifikation .....	19
2.1.7 Essentielle Thrombozythämie.....	19

2.1.7.1	Klinik .....	19
2.1.7.2	Diagnose .....	20
2.1.7.3	Risikostratifikation .....	21
2.1.8	Primäre Myelofibrose .....	21
2.1.8.1	Klinik .....	22
2.1.8.2	Diagnose .....	22
2.1.8.3	Risikostratifikation .....	26
2.1.9	Therapie und Prognose .....	27
2.1.9.1	Kurative Therapie .....	27
2.1.9.2	Symptomatische Therapie .....	29
2.1.9.3	Zytoreduktive Therapie .....	31
2.1.9.4	Prognose .....	35
2.2	Ruxolitinib .....	39
2.2.1	Wirkmechanismus .....	39
2.2.2	Indikationen .....	40
2.2.3	Nebenwirkungen .....	40
2.3	Das angeborene Immunsystem .....	44
2.3.1	Neutrophile Granulozyten .....	44
2.3.1.1	Auswanderung und Aktivierung .....	44
2.3.1.2	JAK/STAT-Signaling .....	46
2.3.1.3	Effektorfunktionen .....	47
2.3.1.4	Die Rolle in MPN .....	49
3	Material und Methoden .....	51
3.1	Material .....	51
3.1.1	Patient*innenkollektiv .....	51
3.1.1.1	Einschlusskriterien .....	52
3.1.1.2	Ausschlusskriterien .....	52

3.1.2	Kontrollgruppen .....	52
3.1.3	Versuchsräumlichkeiten.....	53
3.1.4	Verwendete Materialien .....	53
3.1.4.1	Puffer .....	53
3.1.4.2	Reagenzien.....	53
3.1.4.3	Antikörper.....	54
3.1.4.4	Verbrauchsmaterialien .....	54
3.1.5	Geräte.....	54
3.2	Methoden .....	55
3.2.1	Funktionsmessung der PMNs – Vollblut FACS-Protokoll .....	55
3.2.2	Durchflusszytometrische Analyse .....	56
3.2.3	Statistische Auswertung .....	58
4	Ergebnisse .....	59
4.1	Demographische Daten.....	59
4.1.1	Patient*innen .....	59
4.1.2	Kontrollgruppen .....	60
4.2	Oberflächenexpressionsmuster der PMNs.....	63
4.3	Funktionsmessungen der neutrophilen Granulozyten .....	64
4.3.1	Oxidativer Burst .....	64
4.3.2	Degranulation .....	66
4.3.3	Phagozytotische Aktivität.....	67
5	Diskussion .....	68
5.1	Patient*innenkollektiv und Kontrollgruppe .....	68
5.2	Ruxolitinib beeinträchtigt die Zellen des Immunsystems in ihrer Funktion ...	71
5.3	Wer war zuerst da, Inflammation oder Mutation? .....	76
5.4	Ruxolitinib gegen die Inflammation .....	79
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	81

7	Literaturverzeichnis.....	83
8	Anhang .....	I
9	Danksagung.....	III
10	Tabellarischer Lebenslauf .....	IV

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: JAK/STAT-Signalweg in BCR-ABL1 negativen MPN nach O' Sullivan et al. (19) .....	5
Abbildung 2: Der Einfluss von Ruxolintinib auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems aus Elli et al.(7).....	43
Abbildung 3: Gating-Technik zur Auswertung der PMN-Funktionen .....	57
Abbildung 4: Beispielanalyse der Degranulation von CD11b, CD66b, des oxidativen burst, sowie der phagozytotischen Aktivität eines MPN-Patienten unter Therapie mit Ruxolitinib.....	57
Abbildung 5: Verteilung der Mutationen in Patient*innen mit Ruxolitinib .....	60
Abbildung 6: Verteilung der Mutationen in MPN ohne Ruxolitinib .....	61
Abbildung 7: Gegenüberstellung der CD11b Expression auf PMNs der Patient*innen unter Ruxolitinib und beiden Kontrollgruppen.....	63
Abbildung 8: Gegenüberstellung der CD66b Expression auf PMNs der Patient*innen unter Ruxolitinib und beiden Kontrollgruppen.....	63
Abbildung 9: Vergleich des oxidativen burst zwischen der Patient*innengruppe und beiden Kontrollgruppen .....	64
Abbildung 10: Vergleich der Expression von CD66b zwischen der Patient*innengruppe und beiden Kontrollgruppen.....	66
Abbildung 11: Vergleich der Degranulation von CD11b zwischen der Patient*innengruppe und beiden Kontrollgruppen.....	66
Abbildung 12: Vergleich der phagozytotischen Aktivität der Patient*innengruppe mit beiden Kontrollgruppen .....	67



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der Mutationen in den Subtypen der BCR-ABL1 negativen MPN modifiziert nach Lengfelder et al. (2) .....	4
Tabelle 2: Nichtspezifische Mutationen der BCR-ABL1 negativen MPN modifiziert nach Tefferi et al. (4), McPherson et al. (24) und Zoi et al. (25) .....	8
Tabelle 3: Überblick über wichtige Entzündungsmarker in MPN modifiziert nach Kiem et al. (44) .....	11
Tabelle 4: WHO-Klassifikation myeloischer Neoplasien und akuter Leukämien modifiziert nach Arber et al. (1) .....	12
Tabelle 5: Diagnostik bei Verdacht auf CML modifiziert nach Hochhaus et al. (18) ..	14
Tabelle 6: Kriterien der akzelerierten Phase nach der WHO-Definition 2016 nach Arber et al. (1) .....	14
Tabelle 7: Kriterien der Blastenkrise modifiziert nach Vardiman et al. (50) und Schiffer et al. (51) .....	16
Tabelle 8: Diagnosekriterien der PV modifiziert nach Arber et al. (1) .....	18
Tabelle 9: Diagnosekriterien der ET nach Arber et al. (1) .....	20
Tabelle 10: Grade der Myelofibrose nach Arber et al. (1) .....	23
Tabelle 11: WHO Kriterien der präPMF nach Arber et al. (1) .....	24
Tabelle 12: WHO Kriterien der overt PMF nach Arber et al. (1) .....	24
Tabelle 13: WHO Kriterien Post-PV-MF modifiziert nach Grieshammer et al. (69) ...	25
Tabelle 14: WHO Kriterien Post-ET-MF modifiziert nach Grieshammer et al. (69) ...	26
Tabelle 15: Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation in CML modifiziert nach Hochhaus et al. (18) .....	28
Tabelle 16: Prognostische Einteilung des IPSS-Scores nach Grieshammer et al. (69) .....	36
Tabelle 17: Prognose der CML nach ELTS modifiziert nach Pfirrmann et al. (91) und Hochhaus et al. (92) .....	37
Tabelle 18: Faktoren des ELTS nach Pfirrmann et al. (91) .....	37

Tabelle 19: Allgemeine Parameter der Patient*innen.....	51
Tabelle 20: Diagnosen (nach WHO 2016) der Patient*innen .....	51
Tabelle 21: Allgemeine Parameter der gesunden Proband*innen.....	52
Tabelle 22: Allgemeine Parameter der Patient*innen mit MPN ohne Ruxolitinib.....	53
Tabelle 23: FACS-Antikörper der Funktionsmessung .....	54
Tabelle 24: Therapien der Proband*innen mit MPN ohne Ruxolitinib.....	61
Tabelle 25: DIPSS-Score: Faktoren und Gewichtung der Einzelparameter nach Grießhammer et al. (69).....	I
Tabelle 26: Prognostische Einteilung des DIPPS Scores nach Grießhammer et al. (69).....	I
Tabelle 27: DIPPS-plus Score: Faktoren und Gewichtung der Einzelparameter nach Grießhammer et al. (69).....	I
Tabelle 28: Prognostische Einteilung des DIPPS-plus Scores nach Grießhammer et al. (69).....	II

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ABL	Abelson
ADP	Adenosindiphosphat
ANC	<i>absolute neutrophil count</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
BAT	<i>best available therapy</i>
BCR	Breakpoint-Cluster-Region
CALR	Calreticulin
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CNL	Chronische Neutrophilenleukämie
DC	Dendritische Zellen
DIPSS	<i>dynamic international prognostic scoring system</i>
EGFR	<i>epidermal-growth-factor-receptor</i>
ELTS	EUTOS-Long Term Survival
EPO	Erythropoietin
EPO-R	EPO-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
ESGL	<i>E-selectin glycoprotein ligand</i>
ET	Essentielle Thrombozythämie
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
g/dl	Gramm pro Deziliter

G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
G-CSF-R	G-CSF-Rezeptor
GIST	Gastrointestinale Stromatumore
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
HIF1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HOCl	hypochlorige Säure
HU	Hydroxyurea
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPSET	<i>international prognostic score of thrombosis</i>
IPSS	<i>international prognostic scoring system</i>
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
L	Liter
l/min	Liter pro Minute
LCN-2	Lipocalin-2
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
MAPK	RAS/mitogen-activated Protein Kinase
MF	Myelofibrose
MFI	<i>mean fluorescence intensities</i>
MPL	Myeloproliferatives Leukämie Protein/ Thrombopoietin-Rezeptor
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
MPN, U	unklassifizierbare MPN

NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Proton/Wasserstoffion
NET	<i>neutrophil-extrazellulär trap</i>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NK	Natürliche Killerzellen
nM	nanoMol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>not otherwise specified</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Peg-IFN $\alpha$ -2a	Pegyliertes Interferon alpha 2a
PFA	<i>platelet-activating factor</i>
Ph	Philadelphia
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKI	Proteinkinaseinhibitoren
PLT	Thrombozyten
PMF	Primäre Myelofibrose
PMN	Polymorphonukleäre Granulozyten
PSGL	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>
PV	Polyzythaemia vera
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase- Kettenreaktion
SE	Standardabweichung
sIL	<i>soluble</i> /lösliches Interleukin
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Treg	Regulatorische T-Zellen
TYK	Tyrosinkinase
WBC	Leukozytenzahl

WT

Wildtyp

# 1 Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

Die Myeloproliferativen Neoplasien, früher auch als chronische myeloproliferative Erkrankungen bezeichnet, sind eine seltene Untergruppe der myeloischen Neoplasien (1). Sie selbst können weiterhin in verschiedene Entitäten unterteilt werden: Die wichtigsten, und auch häufigsten, Unterformen sind die Chronische myeloische Leukämie, die Polycythaemia vera, die Essentielle Thrombozythämien sowie die Primäre Myelofibrose (2). Während bei der chronischen myeloischen Leukämie mit dem Philadelphia-Chromosom bzw. dem *breakpoint cluster region* (BCR)-Abelson (ABL)-Fusionsgen ein pathognomonischer klonaler Marker gefunden werden, und damit auch als therapeutisches Ziel genutzt werden konnte, entdeckte man bei den anderen myeloproliferativen Neoplasien sogenannte Treibermutationen. Diese liegen im Januskinase-, Calreticulin- und Thrombopoietin-Rezeptor-Gen, und kommen unspezifisch in allen MPN-Subtypen vor. Diese Mutationen führen zu Steigerung der Hämatopoiese, je nach Subtyp expandieren unterschiedliche Zellreihen, und ausdifferenzierte Zellen werden ins periphere Blut geschwemmt (3, 4).

Therapeutisch gibt es eine große Bandbreite an Möglichkeiten: Von watch and wait, über Aderlass und zytoreduktive Therapie bis hin zur allogenen Stammzelltransplantation. Der Januskinaseinhibitor Ruxolitinib wird seit 2012 erfolgreich in der Therapie der Primären Myelofibrose und Polycythaemia vera eingesetzt (5). Seitdem wurden immer wieder Berichte veröffentlicht, die eine Assoziation der Therapie mit Ruxolitinib und dem Auftreten von bakteriellen, viralen aber auch parasitären Infektionen feststellen (6). Dies veranlasste die Untersuchung verschiedener an der Infektabwehr beteiligter Zellen unter Einwirken von Ruxolitinib: Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen sowie Subgruppen von T-Lymphozyten wie Th1, Th17 als auch T<sub>reg</sub>, zeigten sich in ihren Funktionen beeinflusst (7).

Auch die neutrophilen Granulozyten sind als Zellen des angeborenen Immunsystems an der Infektabwehr beteiligt (8). Die Signaltransduktion erfolgt über eine Vielzahl von Proteinen und Rezeptoren; unter anderem beteiligt sind die Januskinasen, die auch von Ruxolitinib inhibiert werden (9).

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt also vordergründig darin, analog zu den bereits erfolgten Untersuchungen, den Einfluss von Ruxolitinib, aber auch der

## Einleitung und Zielsetzung der Dissertation

myeloproliferativen Neoplasien selbst, auf die neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. In Zuge dessen werden die Funktionen des oxidativen burst, der Degranulation sowie der Phagozytose unter Einfluss verschiedener Stimulantien beleuchtet.

Zusätzlich zur Untersuchung der neutrophilen Granulozyten, soll ein Augenmerk auf die Rolle der Inflammation in der Pathogenese der myeloproliferativen Neoplasien gerichtet werden. Diese wird in den letzten Jahren immer häufiger als eigentliche Ursache des Auftretens der mutierten Zellklone postuliert (10). Da Ruxolitinib über Hemmung der Januskinase nicht nur die Hämatopoiese, sondern auch proinflammatorische Signale beeinflusst, ergeben sich, neben den infektiologischen Einschränkungen, auch Chancen für den Einsatz des Medikaments, die in dieser Dissertation ausgeführt werden sollen.



## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Myeloproliferative Neoplasien**

#### **2.1.1 Definition**

Die Myeloproliferativen Neoplasien (MPN) sind eine Untergruppe der chronisch myeloischen Neoplasien. Ihr Kennmerkmal ist eine Steigerung der Hämatopoiese mit Expansion von terminal differenzierten Zellen der myeloischen Zellreihen ins periphere Blut. Ihnen gemein sind Mutationen, die eine Aktivierung von proliferativen Signalwegen hervorrufen. Dies, sowie die Tatsache, dass sich die MPN auch phänotypisch stark ähneln, führt dazu, dass sich eine genaue Differenzierung der MPN häufig schwierig darstellt. Zudem kann eine Umwandlung einer jeden MPN in eine andere MPN erfolgen (1, 3, 11). Zu den MPN zählen folgende Erkrankungen: Chronisch myeloische Leukämie (CML), Chronische Neutrophilenleukämie (CNL), Polyzythaemia vera (PV), primäre Myelofibrose (PMF), essentielle Thrombozythämie (ET), Chronische Eosinophilenleukämie not otherwise specified (NOS) sowie unklassifizierbare MPN (MPN, U) (2).

In dieser Arbeit wird vor allem auf die drei Entitäten PV, PMF und ET eingegangen, da diese, neben der CML, die häufigsten Typen der MPN darstellen.

#### **2.1.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz beträgt ca. 0,56 pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland. Damit handelt es sich um eine seltene hämatologische Erkrankung. Das Geschlechterverhältnis ist insgesamt ausgeglichen, dies variiert allerdings innerhalb der einzelnen Subtypen der MPN. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 70,5 Jahren (12). Trotz dessen sind die MPN nicht ausschließlich Erkrankungen des alten Menschen, auch Kinder können betroffen sein. Außerdem wurden familiäre Häufungen beobachtet (13).

Epidemiologische Studien aus anderen Ländern, vor allem den USA, legen eine erhöhte Inzidenz im Alter nahe, sodass es durchaus aufgrund des demographischen Wandels in den folgenden Jahrzehnten zu einer gesteigerten Inzidenz der MPN kommen kann (14).

Zudem muss hier erwähnt werden, dass epidemiologische Daten aus Deutschland zu den MPN rar sind, da diese bis Ende 2019 noch nicht generell in den deutschen Krebsregistern erfasst wurden (12).

### 2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Pathogenese der MPN ist noch nicht abschließend geklärt.

2005 gelang ein erster Durchbruch mit der Identifizierung der Mutation in dem Gen, das für die Tyrosinkinase Januskinase (JAK) 2 kodiert: JAK2V617F(15, 16). Diese wird, zusammen mit Mutationen im Myeloproliferativen Leukämie Protein –Gen (MPL), welches den Thrombopoietin-Rezeptor kodiert, und im Calreticulin (CALR)-Gen, zu den Treibermutationen der MPN gezählt. Im Unterschied zur BCR-ABL1-Mutation, die pathognomonisch für die CML ist, sind diese Mutationen allerdings nicht spezifisch für einzelne MPN-Subtypen. Die Verteilung der einzelnen Mutationen auf die Subtypen PV, ET und PMF kann Tabelle 1 entnommen werden (2).

Tabelle 1: Verteilung der Mutationen in den Subtypen der BCR-ABL1 negativen MPN modifiziert nach Lengfelder et al. (2)

Erkrankung	JAK2	MPL	CALR
PV	98%		
ET	60 bis 65%	3 bis 5%	20 bis 30%
PMF	60 bis 65%	20 bis 30%	5 bis 8%

#### 2.1.3.1 BCR-ABL1-Mutation

Die BCR-ABL1-Mutation entsteht durch eine Translokation des Gens, das die Abelson (ABL)- Tyrosinkinase kodiert, in die Region des „breakpoint bluster region“ (BCR)-Gens. Bei den meisten (90-95%) Patient\*innen erfolgt die Translokation reziprok als t(9;22)(q34;q11.2), woraus das Philadelphia (Ph)-Chromosom resultiert. Bei den übrigen Patient\*innen finden Translokationen an anderen Stellen statt, wie beispielsweise t(9;14;22). Teilweise können die Translokationen nicht durch Routinemessungen identifiziert werden, und es bedarf einer detaillierteren Suche. Patient\*innen mit diesen selteneren Mutationen sind dann „Ph negativ“, für BCR-ABL1 aber positiv, denn weiterhin entsteht das Fusionsgen BCR-ABL1. Die

Produkte der Transkription können sich aber dennoch unterscheiden, da zusätzlich die Exons relevant sind, in denen die Fusion stattfindet. So ist der häufigste Fusionsort an Exon 13 oder 14 im BCR-Gen und Exon a2 im ABL-Gen, kurz bezeichnet als e13a2 oder e14a2; das Protein wird als „p210 BCR-ABL1“ bezeichnet. Seltener sind die Fusionsgene e19a2, e1a2 (das korrespondierende Protein heißt „p190 BCR-ABL1“), e1a3 oder e6a2 (17).

All diese BCR-ABL1 Fusionsproteine sorgen für eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität, welche verantwortlich ist für die onkogene Transformation der hämatopoietischen Stammzellen in der CML (17, 18).

### 2.1.3.2 JAK-Mutation

Die JAK-Mutationen stellen die häufigste Entität der sogenannten Treibermutationen der BCR-ABL1 negativen MPN dar. Bei 98% Patient\*innen mit PV, sowie ca. 60-65% der Patient\*innen mit PMF und ET wird diese Mutation beobachtet (2, 11).

JAK 2 gehört zur Familie von vier Tyrosinkinasen: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2. Diese interagieren mit verschiedensten Zytokinrezeptoren, inklusive den Rezeptoren für MPL, Erythropoietin (EPOR), sowie dem Granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSF-R). Damit spielt JAK2 eine zentrale Rolle in der Proliferation und

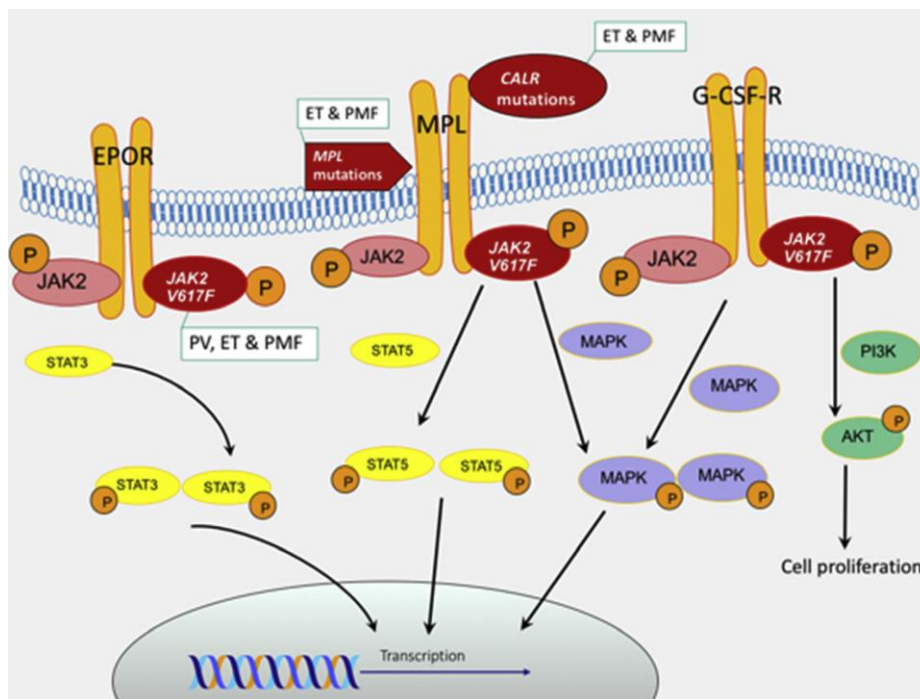


Abbildung 1: JAK/STAT-Signalweg in BCR-ABL1 negativen MPN nach O' Sullivan et al. (19)

Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen. Binden nun also Zytokine an die jeweiligen Rezeptoren, erfolgt eine Autophosphorylierung der JAK, eine Rezeptortransphosphorylierung und Konformationsänderung, damit Signalmoleküle wie Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Proteine binden können. Diese STAT-Moleküle werden ebenfalls nach Bindung phosphoryliert, in den Nucleus transloziert und verändern nun Transkription und Gen-Expression (19-21).

Die häufigste Mutation der JAK ist eine Punktmutation im Exon 14 des JAK2-Gens auf Chromosom 9p: Darin erfolgt ein Ersatz der Aminosäure Phenylalanin durch Valin an Position 617 (V617F). Dies bewirkt eine negative Regulierung der Kinase-Domäne: Folglich werden, ohne Regulierung durch Zytokine, der Phosphatidylinositol-3-Kinase(PI3K)-Weg, welcher die Apoptose reguliert, sowie der RAS/mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Weg, aktiviert. Dies führt über MPL-R, EPO-R und G-CSF-R zur vermehrten Genexpression und Proliferation aller drei myeloischen Zellreihen (11, 19).

Eine Mehrzahl der PV-Patient\*innen, die negativ auf JAK2V617F getestet wurden, zeigen Mutationen in Exon 12 der JAK2, von denen mittlerweile mehr als zwanzig bekannt sind. Auch diese führen zu unregulierter Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, allerdings stellt sich die PV hier mit isolierter Erythrozytose dar, eine Wandlung in eine voll ausgeprägte PV ist aber möglich. Zudem ist eine Mutation in Exon 12 kein Hindernis für eine weitere Mutation in Exon 14 (3, 19, 20).

Zusätzlich zum Ort der Mutation scheinen außerdem Gendosiseffekte, der sogenannte „allel burden“, eine Rolle zu spielen: So sind Patient\*innen mit PV und PMF häufiger homozygot (21-52% und 54%) für JAK2V617F, als Patient\*innen, die an einer ET erkrankt sind (2-4%). Zudem wurde eine Korrelation zwischen höherem „allel burden“ sowie einer weiter fortgeschrittenen Erkrankung und höherem Progressionsrisiko beobachtet (13).

### **2.1.3.3 MPL-Mutationen**

Die MPL-Mutationen stellen die seltensten der drei Treibermutationen dar: Sie werden in Patient\*innen mit ET (3-5%) und PMF (5-8%) beobachtet, nicht jedoch in Patient\*innen mit PV (2).

Die häufigsten Mutationen des MPL betreffen die Aminosäure Tryptophan W515 in Exon 10 des Chromosom 1. Meist erfolgt ein Austausch mit Leucin oder Lysin,

bezeichnet als W515L beziehungsweise (bzw.) W515K. Auch andere Aminosäuren wurden als Tauschpartner beschrieben: Arginin (W515R), Alanin (W515A), Glycin (W515G) und Serin (W515S). Zudem können weitere Genloci betroffen sein wie beispielsweise MPLS505N.

Ebenso wie bei JAK2-Mutationen erfolgt bei Mutationen des MPL eine unregulierte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, welche zu einer Steigerung der Megakaryopoese führt. Wie Exon 12 Mutationen des JAK2 Gens, stellen auch MPL-Mutationen kein Hindernis für eine hinzukommende JAK2V617F- Mutation dar (3, 19, 20).

### **2.1.3.4 CALR-Mutationen**

CALR-Mutationen sind in 20-30% der Patien\*innten, die an PMF oder ET erkrankt sind, zu finden, nicht aber in Patient\*innen mit PV (4).

CALR ist ein Chaperon, das üblicherweise an der Faltung von Glykoproteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie an der Homöostase von Calcium-Ionen beteiligt ist. In MPN bindet das mutierte CALR an MPL und führt zu einer unregulierten Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges in hämatologischen Vorläuferzellen für Megakaryozyten und Granulozyten (22).

Die Mutationen des CALR sind in der Regel Frameshift-Mutationen, mehr als 50 davon wurden beschrieben. Allerdings sind für 80% der Mutationen, zwei Varianten verantwortlich: In der ersten Variante erfolgt eine Deletion von 52 Basenpaaren. Variante zwei liegt eine Insertion von fünf Basenpaaren zu Grunde; sie ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Erstere Variante ist eher mit PMF (Typ 1 75% und Typ 2 15%) assoziiert In ET sind beide Typen ungefähr gleichmäßig verteilt (Typ 1 55% und Typ 2 35%) (15, 19, 23).

### **2.1.3.5 Weitere Mutationen**

Außer den Treibermutationen wurden weitere, zusätzliche Mutationen entdeckt. Eine detaillierte Auflistung der Frequenz, des Funktionsbereiches sowie der Bedeutung für die MPN erfolgt in

Tabelle 2.

Tabelle 2: Nichtspezifische Mutationen der BCR-ABL1 negativen MPN modifiziert nach Tefferi et al. (4), McPherson et al. (24) und Zoi et al. (25)

Mutation	Ort der Regulation	Frequenz in %		
		PV	ET	PMF
<b>„Initiation or landscaping mutations“</b>				
<b>TET2</b>	Epigenetische Regulation	10-20	5	10-20
<b>DNMT3A</b>	Epigenetische Regulation	5-10	1-5	8-12
<b>Krankheitsmodifizierende Mutationen</b>				
<b>ASXL1</b>	Epigenetische Regulation	2	2-5	10-35
<b>IDH1/2</b>	Epigenetische Regulation	1-2	1-2	5-6
<b>EZH2</b>	Epigenetische Regulation	1-2	1-2	7-10
<b>CBL</b>	JAK/STAT-Signalweg	Selten	Selten	5-10
<b>LNK</b>	JAK/STAT-Signalweg	1-2	3-6	3-6
<b>TP53</b>	DNA-Reparatur	Selten	Selten	Selten
<b>SF3B1</b>	mRNA-Splicing	2	2	5
<b>SRSF2</b>	mRNA-Splicing	Selten	Selten	5-17
<b>U2AF1</b>	mRNA-Splicing	Selten	Selten	2-8
<b>ZRSR2</b>	mRNA-Splicing	Selten	Selten	1
<b>IKZF1</b>	Transkription	Selten	Selten	Selten
<b>RUNX1</b>	Transkription	Unbekannt	Unbekannt	Unbekannt

ASXL1, additional sex combs-like 1; CBL, casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene; DNMT3A, DNA cytosine methyltransferase; EZH2, enhancer of zeste homologue 2; IDH1/IDH2, isocitrate dehydrogenase; IKZF1, IKAROS family zinc finger 1; LNK, lymphocyte adapter protein; RUNX1, Runt-related transcription factor 1; SF3B1, splicing factor 3B subunit 1; SRSF2, serine/arginine-rich splicing factor; TET2, TET oncogene family member; TP53, tumor protein p53; U2AF1, U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1; ZRSR2, zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2.

Das Auftreten der „initiation or landscaping mutations“ scheint eine Veränderung des Phänotyps zu bewirken: So wird vermutet, dass der Zeitpunkt des Auftretens von beispielsweise TET2 eine wichtige Rolle spielt: Tritt TET2 zeitlich vor der JAK2V617F-Mutation auf, so scheint sich eher eine ET zu entwickeln; mutiert TET2 erst nach der JAK2V617F Mutation, wird eher eine PV beobachtet (23).

Zudem kann das Feststellen der Nebenmutationen einen Hinweis auf eine Progression der MPN liefern: So ist eine Loss-of-function-Mutation in EZH2 mit einer Progression der PMF sowie einer schlechteren Prognose assoziiert (23).

All diese Mutationen finden sich noch nicht in den Diagnostikkriterien der WHO von 2016 wieder. Allerdings gibt es bereits Bestrebungen neue Prognosescores zu entwickeln, die diese Mutationen zumindest in die prognostische Einschätzung miteinbeziehen (26).

### **2.1.3.6 Inflammation**

Zusätzlich zu den Mutationen, scheint Inflammation eine Rolle bei der Ätiopathogenese, aber auch dem Phänotyp und Fortschreiten der MPN zu spielen (27, 28).

Inflammation ist ein pathologischer Prozess, der typischerweise von äußeren Reizen, wie chemischen oder physikalischen Einflüssen, Strahlung oder auch Infektion, getriggert wird. Zusätzlich dazu, kann auch Hypoxie zu Inflammation führen (29).

Gleich mehrere Studien konnten ein erhöhtes Risiko aktiver Raucher nachweisen an MPN zu erkranken (30-33). Hasselbalch schloss daraus, dass die chronische Entzündung, die Rauchen auslöst, zu Genom-Instabilitäten und damit Bildung neuer maligner Zellklone in den MPN führt (28, 34). Auch scheint es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Exposition von radioaktivem Radon und JAK2V617F-Mutanten zu geben, allerdings gibt es noch keine klare Evidenz, dass Strahlung auch zu einem erhöhten Risiko einer MPN-Erkrankung führt (28). Des Weiteren konnten Kristinsson et al. eine Korrelation zwischen verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn, Polymyalgia rheumatica und weiteren und dem Auftreten myeloproliferativer Neoplasien feststellen (35). Dabei sollte aber die Beeinflussung dieser Daten durch die bereits erfolgte Therapie dieser Erkrankungen mit immunsuppressiven Medikamenten bedacht werden (27). All den oben genannten

möglichen Einflussfaktoren ist gemein, dass sie im Körper zur chronischer Inflammation, DNA-Schäden oder oxidativem Stress führen (27, 28).

Ein entscheidender Faktor für die Initiation der MPN scheint das Bestehen eines entzündlichen Mikromilieus im Knochenmark zu sein. In diesem Milieu zeigen sich die Stammzellen mit JAK2V617F-Mutation nicht beeinträchtigt, während sich JAK2-Wildtyp (WT)-Zellen nur noch eingeschränkt teilen und differenzieren. Weiterhin erfolgt die Induktion zu Apoptose und Quieszenz (36).

Darüber hinaus leisten die mutierten Zellen ihren eigenen Beitrag zum Fortbestand der Inflammation: Eine Genanalyse von Patient\*innen mit MPN von Rodriguez-Meira et al. zeigte eine Anreicherung von Inflammationskaskaden in den mutierten Zellklonen, darunter Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , Interleukin (IL) 6/JAK/STAT3 und Interferon (IFN) $\gamma$  (27, 37). In den Wildtyp-Zellen des gleichen Patient\*innenkollektivs, konnten auch Veränderungen nachgewiesen werden: Eine Anreicherung von transforming growth factor (TGF)  $\beta$  und MYC-Targets im Vergleich zu entsprechenden Zellen gesunder Individuen (37). Dies und weitere Analysen, unter anderem vom differierenden Cluster-Verhalten der WT-Zellen zu dem von Zellen gesunder Patient\*innen, lässt den Schluss zu, dass die mutierten Zellklone normale Bystander-Zellen zur Produktion inflammatorischer Zytokine induzieren und sich damit auf Dauer einen Selektionsvorteil schaffen (27, 37, 38).

Tefferi et al. analysierten das Plasma von 127 PMF-Patient\*innen und konnten erhöhte Messwerte 19 verschiedener Zytokine nachweisen. Einige davon, wie IL-8, löslicher (s)IL-2R, IL-12 und IL-15, waren unabhängige Prädiktoren für ein vermindertes Überleben (39, 40). Im Mausmodell zeigte TNF $\alpha$  sich als ein entscheidender Faktor für oben genannten Überlebensvorteil der JAK2V617F-mutierten Zellklone im inflammatorischen Milieu (36). Dies gilt ebenso für Lipocalin-2 (LCN-2) (41-43). Das alles sind nur einige von vielen Beispielen wie inflammatorische Zytokine an der Initiation und dem Aufrechterhalten der MPN eingreifen. Eine Auflistung weiterer Entzündungsmarker mit ihrer Funktion in MPN finden Sie in



Tabelle 3: Überblick über wichtige Entzündungsmarker in MPN modifiziert nach Kiem et al. (44)

Entzündungsmarker	Rolle
TNF $\alpha$	Wachstum JAK2V617F-mutierter Stammzellen und Unterdrückung von nicht-mutierten Stammzellen
IL-33	Verlängertes Überleben JAK2V617-positiver Zelllinien
IL-11, HGF	Wachstum JAK2V617F-positiver erythroider Vorläuferzellen
IL-6, CXCL10, FGD	Schutz maligner Zellklone gegen JAK2-Inhibition
NF-E2	Leuko-und Thrombozytose, IL-8 Erhöhung
IL-8	Veränderung von Megakaryopoese, Neutrophilie und Erythrozytose
CRP	Korrelation mit allen Burden von JAK2V617F in PV, ET, PMF Prognostischer Marker PMF
IL-8, IL-2R, IL-12, IL-15	Prognostischer Marker PMF
YKL-40	Korrelation mit Progression, Transition zu post-PV MF, Neutrophilie, Thrombozytose, CRP, LDH, JAK2V617F allen Burden
LCN-2	Korrelation mit Neutrophilie in PV, ET, PMF

Auch reactive oxygen species (ROS), also H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und O<sub>2</sub><sup>-</sup> sind Teil des entzündlichen Umfeldes. Sie können Schäden in Zell-DNA bis hin zu Doppelstrangbrüchen triggern (40, 45). Erhöhte Level an ROS konnten sowohl in JAK2V617F-positiven, als auch CALR-mutierten MPN Zellen nachgewiesen werden (40, 46, 47). Marty et al. erreichten durch Einsatz des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) bei JAK2V617F-positiven Mäusen eine Verminderung von Splenomegalie und DNA-Schäden (47). Zudem führen ROS zur Stabilisierung des Hypoxie-

induzierbaren Faktors 1a (HIF1a), welcher wesentlich für das Überleben der JAK2V617-positiven Zellen ist (48). Dies ist in dieser Arbeit vor allem vor dem Hintergrund interessant, da eine Funktion der neutrophilen Granulozyten die Produktion von ROS, oxidativer burst genannt, ist.

#### 2.1.4 WHO-Klassifikation

Tabelle 4: WHO-Klassifikation myeloischer Neoplasien und akuter Leukämien modifiziert nach Arber et al. (1)

---

##### Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Chronische myeloische Leukämie (CML), BCR-ABL1+

Chronische Neutrophilenleukämie (CNL)

Polyzythaemia vera (PV)

Primäre Myelofibrose (PMF)

PMF, präfibrotisch/ Frühstadium

PMF, overt fibrotic

Essentielle Thrombozythämie (ET)

Chronische Eosinophilenleukämie, nicht anders spezifiziert (NOS)

MPN, unklassifizierbar

---

#### 2.1.5 Chronisch myeloische Leukämie

Die Chronisch myeloische Leukämie (CML) nimmt unter den MPN eine Sonderrolle ein, wird von Hochhaus et al. gar als Modellerkrankung für Diagnostik und Therapie neoplastischer Erkrankungen bezeichnet (18). Klassisches Kennzeichen der CML ist das Philadelphia-Chromosom 22q- mit dem BCR-ABL1-Fusionsprotein, welches durch seine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität verantwortlich ist für die onkogene Transformation der hämatopoietischen Stammzelle. Nach der Einführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnte die Therapie so stark verbessert werden, dass sich das Überleben der Patient\*innen an das der Normalbevölkerung annähert.

Klassisch ist zudem der Verlauf der Erkrankung: Zunächst tritt eine stabile chronische Phase auf, in der eine Therapie sehr erfolgreich eingesetzt werden kann, dann folgen die Akzelerationsphase, und schließlich die Blastenkrise, welche einer akuten Leukämie entspricht (17, 18).

Die Inzidenz der CML beträgt 1,2 bis 1,5 /100.000 Einwohner pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 55-60 Jahren, allerdings können alle Altersgruppen betroffen sein (17, 18). Als Risikofaktor für eine Erkrankung konnte ionisierende Strahlung ausgemacht werden (49).

### **2.1.5.1 Klinik**

85% der Patient\*innen werden in der chronischen Phase diagnostiziert, bei Erwachsenen sogar mehr als 95%. In dieser Phase sind Symptome wie Fatigue, Gewichtsverlust, Schwitzen und abdominelles Druckgefühl, aufgrund der Milzvergrößerung, typisch, 20 bis 50% der Patient\*innen sind asymptomatisch. Auch zu Schmerzen im Sternum kann es aufgrund der Expansion des Knochenmarks kommen, ebenso zu Knochenschmerzen im Sinne einer Gichtarthritis durch den hohen Zellumsatz und der damit verbundenen Steigerung von Harnsäure. Zusätzlich kann es zu Anämie, erhöhten Leukozytenzahlen mit Linksverschiebung und einer Veränderung der Thrombozytenzahl, meist hin zur Thrombozytose kommen. Die Thrombozyten können auch in ihrer Funktion beeinträchtigt sein, was zu Blutungen führen kann.

Diese Symptome steigern sich in der akzelerierten Phase. In der Blastenkrise können zusätzlich extramedulläre Gewebe wie Lymphknoten, Haut und Schleimhäute betroffen sein (17, 18).

### **2.1.5.2 Diagnose**

Häufig wird die Diagnose zufällig bei einer Routineblutuntersuchung gestellt. Dabei zeigt sich eine Leukozytose mit durchschnittlich 100.000 Zellen/ $\mu$ l (Spannweite: 12.000 bis 1.000.000/ $\mu$ l), welche im Ausstrich weiter analysiert wird: Sichtbar wird eine breite Vermehrung von Myeloblasten bis hin zu neutrophilen Granulozyten, überwiegend aber Myelozyten und segmentkernige neutrophile Granulozyten. Klassisch ist auch die Darstellung des Hiatus leucaemicus im Blutbild. Zudem tritt meist eine Erhöhung der Zahl basophiler Granulozyten und Monozyten auf. Auch eine Thrombozytose und eine normochrome, normozytäre Anämie sind nicht selten.

## Literaturdiskussion

In der chronischen Phase zählt man <2% Blasten. Definitionsgemäß beginnt zwischen 15 bis 19% die akzelerierte Phase; findet man 20% oder mehr Blasten ist dies das Kriterium für den Übergang in eine Blastenkrise.

Zusätzlich zur Untersuchung des peripheren venösen Blutes sollte eine Untersuchung des Knochenmarks durchgeführt und die oben beschriebenen Blutbildveränderung bestätigt werden. Auch eine Fibrose sowie erhöhte Vaskularisierung des Markraums können beobachtet werden. Im Gegensatz zu den BCR-ABL- negativen MPN wie PV, ET und PMF sind die Megakaryozyten verkleinert und hypolobuliert und werden als „dwarf- megakaryozytes“ bezeichnet.

Da das Hauptdiagnosekriterium der CML aber der Nachweis des BCR-ABL1-Fusionsgens oder dessen Produkt, der BCR-ABL1 mRNA, ist, müssen diese auch via Karyotypisierung, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) oder Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nachgewiesen werden.

Diese diagnostischen Methoden, sowie natürlich Anamnese (mit besonderem Fokus auf die oben genannten Symptome) und klinisch körperliche Untersuchung (hier liegt das Hauptaugenmerk auf dem Nachweis einer Leber- oder Milzvergrößerung), sind die Pfeiler der Diagnostik der CML und in Tabelle 5 noch einmal übersichtlich dargestellt (17, 18).

Tabelle 5: Diagnostik bei Verdacht auf CML modifiziert nach Hochhaus et al. (18)

<b>Untersuchung</b>	<b>Anmerkung</b>
<b>Anamnese</b>	Abgeschlagenheit, Schwäche, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Knochenschmerzen oder Oberbauchbeschwerden bei Milzvergrößerung
<b>Körperliche Untersuchung</b>	Milz- und Lebergröße
<b>Blutbild</b>	Leukozyten mit Differenzialblutbild, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit
<b>Peripheres Blut</b>	Multiplex-PCR auf BCR-ABL1-Transkripte
<b>Knochenmarksaspirat</b>	Zytologie (Blasten, Basophile, Megakaryozytenmorphologie, kontinuierliche Linksverschiebung) Zytogenetik (Metaphasen-Analyse)

Im Verlauf der Erkrankung muss immer überprüft werden, ob und inwiefern ein Fortschreiten der Erkrankung in die akzelerierte Phase, hierin ist auch das Ansprechen auf die klassische Therapie mit TKIs inbegriffen, oder die Blastenkrise zu erkennen ist (18). Diese Kriterien werden in Tabelle 6 und

Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Kriterien der akzelerierten Phase nach der WHO-Definition 2016 nach Arber et al. (1)

**Any 1 or more of the following hematologic/cytogenetic criteria or response-to-TKI criteria:**

Persistent or increasing WBC ( $>10 \times 10^9/L$ ), unresponsive to therapy

Persistent or increasing splenomegaly, unresponsive to therapy

Persistent thrombocytosis ( $>1000 \times 10^9/L$ ), unresponsive to therapy

Persistent thrombocytopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) unrelated to therapy

20% or more basophils in the PB

10%-19% blasts† in the PB and/or BM

Additional clonal chromosomal abnormalities in Ph1 cells at diagnosis that include “major route” abnormalities (second Ph, trisomy 8, isochromosome 17q, trisomy 19), complex karyotype, or abnormalities of 3q26.2

Any new clonal chromosomal abnormality in Ph1 cells that occurs during therapy

**Provisional response-to-TKI criteria**

Hematologic resistance to the first TKI (or failure to achieve a complete hematologic response\* to the first TKI) or

Any hematological, cytogenetic, or molecular indications of resistance to 2 sequential TKIs or

Occurrence of 2 or more mutations in BCR-ABL1 during TKI therapy

Large clusters or sheets of small, abnormal megakaryocytes, associated with marked reticulin or collagen fibrosis in biopsy specimens may be considered as presumptive evidence of AP, although these findings are usually associated with 1 or more of the criteria listed above.; \*Complete hematologic response: WBC,  $<10 \times 10^9/L$ ; platelet count,  $<450 \times 10^9/L$ , no immature granulocytes in the differential, and spleen nonpalpable. ; †The finding of bona fide lymphoblasts in the blood or marrow, even

## Literaturdiskussion

if,10%, should prompt concern that lymphoblastic transformation may be imminent and warrants further clinical and genetic investigation; 20% or more blasts in blood or BM, or an infiltrative proliferation of blasts in an extramedullary site is CML, blast phase.

Tabelle 7: Kriterien der Blastenkrise modifiziert nach Vardiman et al. (50) und Schiffer et al. (51)

---

### One or more of the following findings:

**≥20 percent peripheral blood or bone marrow blasts**

**Presence of extramedullary blastic infiltrates**

**Large foci or clusters of blasts on the bone marrow biopsy**

---

### 2.1.5.3 Risikostratifikation

Die Therapie der CML erfolgt nicht adaptiert an eine Risikostratifikation, sondern an die jeweilige Phase der Krankheit, das Alter der Patient\*innen, Möglichkeiten der Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation, und das Ansprechen auf eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (51). Die Prognosescores sowie die daraus ableitbare Prognose der Patient\*innen werden unter Punkt 2.1.9.4 besprochen.

### 2.1.6 Polyzythaemia vera

PV, auch Polyzythaemia rubra vera oder Vaquez-Osler-Krankheit, ist gekennzeichnet durch eine Vermehrung aller drei Blutzellreihen, mehrheitlich von Erythrozyten, aber auch Leuko- und Thrombozyten, und deren Ausschwemmen ins periphere Blut (52). Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung beträgt 60 Jahre, allerdings sind 25% der Patient\*innen unter 50 Jahre, 10% gar unter 40 Jahre (53). Zudem scheint die Diagnose bei Männern häufiger als bei Frauen (54).

Insgesamt ist das Gesamtüberleben der Patient\*innen verkürzt, unbehandelt beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung 18 Monate, durch die Behandlung kann sie auf mindestens 13 Jahre gesteigert werden (55).

### **2.1.6.1 Klinik**

Meist werden die Patient\*innen eher zufällig durch erhöhte Hämoglobin- (Hb) und/oder Hämatokrit (Hkt)- Werte in einer Routineblutuntersuchung entdeckt. In frühen Krankheitsstadien stehen vor allem Symptome im Vordergrund, die durch die erhöhte Blutviskosität, und damit einhergehend Mikrozirkulationsstörungen, bedingt sind: Gerötete Haut des Gesichtes, Erythromelalgie, Kopfdruck bis hin zu -schmerzen, Hypertonie, Sehstörungen, Parästhesien, aquagener Pruritus, Schwindel und auch Fatigue. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu Komplikationen wie venösen Thrombosen oder auch, wenn die Thrombozytenzahl erhöht oder ein damit assoziiertes erworbenes von Willebrand-Syndrom vorliegt, schweren Blutungen. Zusätzlich können gastrointestinale Symptome bis zu Erosionen und Ulzera auftreten (14, 52, 53, 56). Außerdem kann ein Fortschreiten in eine Post-PV-PMF (siehe unter 2.1.8), die Exazerbation in eine AML (10 bis 25%) oder ein MDS beobachtet werden (11, 57).

### **2.1.6.2 Diagnose**

Zunächst sollte die Anamnese erhoben werden. Dabei müssen insbesondere Fragen nach Thrombosen in der Vergangenheit und dem Auftreten eines Budd-Chiari-Syndrom, v.a. bei Frauen unter 45 Jahren, gestellt werden. Zusätzlich sollten klassische Symptome der PV (siehe oben) und kardiovaskuläre Risikofaktoren (unter anderem Hypertonus, Diabetes mellitus, Übergewicht, Blutfettwerte, Nikotin-Konsum und die familiäre Belastung) erfragt werden. Im Anschluss zur klinischen Untersuchung (besonders empfohlen wird der Versuch des Tastens von vergrößerter Milz und Leber) empfiehlt sich eine Untersuchung von peripher-venösem Blut. Ziel dessen ist es, nicht maligne Differentialdiagnosen auszuschließen, reaktive Ursachen für die Blutbildveränderungen zu erkennen und eine Unterscheidung zu anderen Subtypen der MPN zu ermöglichen.

Folgende Befunde können nach Tefferi et al.(53) im peripheren Blut festgestellt werden. In Klammern befindet sich jeweils die Häufigkeit bei PV-Patienten:

- Hb >18,5g/dl (73%), normochrom und normozytär
- WBC >10.500/µl (49%)
- PLTs >450.000/µl (53%); >1.000.000/µl (4%)
- Erhöhtes LDH (50%)
- Verringerte EPO-Spiegel (81%)

## Literaturdiskussion

---

- Abnormaler Karyotyp (12%)

Zusätzlich zur Messung des Blutbildes sollte das periphere Blut auf JAK2V61F, oder, wenn ersteres negativ ausfällt, auf Exon 12-Mutationen im JAK2-Gen untersucht werden.

Ist anhand dieser Kriterien die Diagnose PV noch nicht zu stellen, erfolgt weiter eine Knochenmarksaspiration und –biopsie mit Untersuchung von Ausmaß der Zellularität, der Fibrose und der Anzahl CD34-positiver Zellen. Kann dort eine Hyperzellularität mit Panmyelose von Erythrozyten, Granulozyten und Megakaryozyten festgestellt werden, kann die Diagnose „PV“ gestellt werden (55). Siehe dazu auch Tabelle 8

Tabelle 8: Diagnosekriterien der PV modifiziert nach Arber et al. (1)

---

### WHO PV criteria

#### Major criteria

1. Hemoglobin >16.5 g/dL in men

Hemoglobin >16.0 g/dL in women

Or

Hematocrit >49% in men

Hematocrit >48% in women

Or

increased red cell mass (RCM)\*

2. Bone marrow biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) including prominent erythroid, granulocytic, and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (differences in size)

3. Presence of JAK2V617F or JAK2 exon 12 mutation

#### Minor criterion

Subnormal serum erythropoietin level

Diagnosis of PV requires meeting either all 3 major criteria, or the first 2 major criteria and the minor criterion†

---



## Literaturdiskussion

\*More than 25% above mean normal predicted value; †Criterion number 2 (BM biopsy) may not be required in cases with sustained absolute erythrocytosis: hemoglobin levels  $\geq 18.5$  g/dL in men (hematocrit, 55.5%) or  $\geq 16.5$  g/dL in women (hematocrit, 49.5%) if major criterion 3 and the minor criterion are present. However, initial myelofibrosis (present in up to 20% of patients) can only be detected by performing a BM biopsy; this finding may predict a more rapid progression to overt myelofibrosis (post-PV MF).

Bei Patient\*innen, die eine Erhöhung der Thrombozytenzahl auf  $>1.000.000/\mu\text{l}$  aufweisen, sollte zusätzlich auf ein erworbenes von Willebrandt-Syndrom getestet werden (55).

### 2.1.6.3 Risikostratifikation

Die Therapie der PV erfolgt adaptiert an das Risiko eines thrombotischen Ereignisses, da dies die Hauptursache für abwendbare Todesfälle darstellt. Dazu erfolgt eine Einteilung der Patient\*innen anhand ihres Alters bei Erstdiagnose ( $>60$  Jahre und  $\leq 60$  Jahre), sowie des Auftretens von Thrombosen in der Vorgeschichte: Patient\*innen  $\leq 60$  Jahre mit keiner Thrombose in der Vorgeschichte werden „low risk“, sprich der Risikogruppe mit niedrigerem Risiko zugerechnet, alle anderen zählen zur „high risk“- Gruppe (55).

### 2.1.7 Essentielle Thrombozythämie

Die ET oder auch primäre Thrombozytose ist geprägt von exzessiver, klonaler Thrombozytenproduktion (58, 59). Laut US-amerikanischer Studien scheinen Frauen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer ET zu haben, außerdem wurde eine höhere Inzidenz unter Afroamerikanern und niedrigere Inzidenzraten unter Hispanics und Asian Pacific Islandern im Vergleich zur weißen Bevölkerung festgestellt (60). Das durchschnittliche Alter bei Diagnose beträgt 50 Jahre, allerdings ist die Altersspanne mit 17 bis 98 Jahre sehr groß (61).

Im Gegensatz zu PV und PMF haben Patient\*innen mit ET eine normale Lebenserwartung. Trotzdem ist diese beeinflusst von Komplikationen der Erkrankung (62).

#### 2.1.7.1 Klinik

Ähnlich wie bei der PV wird die ET in bis zu 50% der Fälle zufällig bei einer Blutuntersuchung aus anderen Gründen entdeckt. Es treten die gleichen Symptome wie bei der PV auf, allerdings ist Pruritus ein sehr seltenes Ereignis bei Patient\*innen mit ET (5%). Zusätzlich werden asymptomatische pulmonale Hypertonien beobachtet, sowie ein erhöhtes Abort-Risiko (in 11% der Patientinnen im ersten

Trimester der Schwangerschaft) (58, 61). Die ET kann außerdem fortschreiten in eine Post-ET-PMF (siehe unten), MDS oder auch in seltenen Fällen (<5%) in eine AML (11).

### 2.1.7.2 Diagnose

Auch die Diagnose folgt dem gleichen Algorithmus wie die der PV. Nach einer Studie von Wolanskyj et al. (61) können folgende Laborwerte bei Patient\*innen mit ET erhoben werden. In Klammern dahinter wird die jeweilige Spannweite angegeben:

- Mittlerer Hb 13,7 g/dl (9,1- 16,8)
- Mittlere WBC  $9 \times 10^3 /\mu\text{l}$  (4,1 – 25,2)
- Mittlere PLTs  $1000 \times 10^3 /\mu\text{l}$  (454 bis 3460)

Anstelle des Screenings auf JAK2-Exon 12-Mutationen, erfolgen zur Diagnose der ET Untersuchungen auf CALR- und MPL-Mutationen bei JAK2V617F-negativen Patient\*innen. Falls die Patient\*innen negativ auf alle drei dieser Mutationen getestet werden, die Diagnose aber nicht ausgeschlossen werden kann, ist ein Nachweis der Klonalität der ET auch mit Testung auf die unter 2.1.3.5 aufgeführten Mutationen möglich.

Die Knochenmarksbiopsie zeigt Normozellularität bis zu moderater Hyperzellularität, eine Panzytose mit stark vermehrten, vergrößerten Megakaryozyten, welche in lockeren Gruppen gelagert, deren Kerne hyperlobuliert sind und sich hirschgeweihartig darstellen.

Zusätzlich müssen weitere Erkrankungen ausgeschlossen werden: Durch die Knochenmarksbiopsie können MDS und PMF ausgeschlossen werden, zum Ausschluss der CML erfolgt eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder eine RT-PCR auf die BCR-ABL1-Mutation (58, 59). Eine Übersicht liefert Tabelle 9.

Tabelle 9: Diagnosekriterien der ET nach Arber et al. (1)

---

#### WHO ET criteria

##### Major criteria

1. Platelet count  $>450 \times 10^9 /\text{L}$

2. Bone marrow biopsy showing proliferation mainly of the megakaryocyte lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes with hyperlobulated nuclei. No

## Literaturdiskussion

significant increase or left shift in neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers

3. Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 CML, PV, PMF, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms

4. Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation

### Minor criterion

Presence of a clonal marker or absence of evidence for reactive thrombocytosis

Diagnosis of ET requires meeting all 4 major criteria or the first 3 major criteria and the minor criterion

---

### 2.1.7.3 Risikostratifikation

Die Hauptkomplikation der ET ist das Entwickeln einer Thrombose: Zum Risikoassessment nach dem International Prognostic Score of Thrombosis (IPSET) der WHO gehören das Alter, die Art der JAK2-Mutation, sowie Thrombosen in der Vergangenheit (63):

- High-risk: Thrombosen in der Vergangenheit in jedem Alter und/ oder Alter >60 Jahre mit JAK2V617F
- Intermediate-risk: Alter >60 Jahre, keine JAK2-Mutation, keine Thrombosen in der Vergangenheit
- Low-risk: Alter ≤60 Jahre mit JAK2-Mutation, keine Thrombosen in der Vergangenheit
- Very Low-risk: Alter ≤60 Jahre, keine JAK2-Mutation, keine Thrombosen in der Vergangenheit

Zusätzlich wird empfohlen kardiovaskuläre Risikofaktoren mit einzubeziehen. Angepasst an diese Risikogruppen erfolgt die Therapie (62).

### 2.1.8 Primäre Myelofibrose

Die Myelofibrose (MF) ist gekennzeichnet durch die Fibrosierung des Markraumes des Knochens mit daraus resultierender Zytopenie. Sie kann primär (PMF), aber auch sekundär als Post-PV- oder Post-ET-MF auftreten.

Die PMF stellt mit einer Inzidenz von 1,5 pro 100.000 Einwohner/ Jahr die seltenste der BCR-ABL1-negativen MPN dar (64). Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 67 Jahre, allerdings werden 17% der Patient\*innen schon mit unter 50 Jahren diagnostiziert, 5% sogar unter 40 Jahren (65).

Das mediane Gesamtüberleben beträgt lediglich sechs Jahre; damit ist die PMF die aggressivste der MPN (66, 67).

### **2.1.8.1 Klinik**

Das häufigste Symptom der PMF ist die schwere Fatigue, die bei 50 bis 70% der Patient\*innen auftritt. Zusätzlich ergeben sich Symptome durch die Vergrößerung der Milz und Leber durch extramedulläre Hämatopoese und thrombotische Ereignisse (2%): Diese treten ungefähr gleich häufig wie in der ET, aber signifikant seltener als in der PV auf (65, 68). Außerdem kann es einhergehend mit der Knochenmarksfibrose zu Schmerzen in Knochen und Gelenken, überwiegend der unteren Extremität, kommen. Weiterhin zeigten sich Pruritus und pulmonale Hypertonie, die mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert scheint (65). 15 bis 30% der Patient\*innen sind, zumindest zum Diagnosezeitpunkt, aber asymptomatisch (65).

### **2.1.8.2 Diagnose**

Diagnostisch folgt die PMF dem Vorgehen der ET und PV. Neben der Spleno- und Hepatomegalie fällt vor allem eine Anämie auf. 50% der Patient\*innen weisen einen Hb-Wert unter 10 g/dl, 20% sogar unter 8g/dl auf. Dabei ist allerdings die absolute, aber auch die relative Retikulozytenzahl nicht oder nur inadäquat erhöht. Bei einigen Patient\*innen resultiert die Anämie aus einer Hämolyse, welche mit einer Bestimmung der Hämolyseparameter nachgewiesen werden kann. Im Blutausstrich sind eine Poikilozytose, Anisozytose und Dakrozytose der Erythrozyten nachzuweisen (65, 69).

Thrombozyten- und Leukozytenzahlen sind sehr variabel in der PMF. Im Frühstadium, vor allem der präfibrotischen PMF, liegt häufig eine Thrombozythämie vor. Zusätzlich dazu besteht häufig auch eine Leukozytose. Mit Progression der Erkrankung wandelt sich das Blutbild hin zu einem Mangel an Thrombozyten und Leukozyten. Erstere können vergrößert sein und eine veränderte Granulation aufweisen. Die Variabilität in den Leukozytenzahlen lässt sich vor allem auf die Veränderungen der neutrophilen Granulozyten zurückführen. Zusätzlich ist in fortgeschrittenen Stadien im Blutausstrich ein leukoerythroblastisches Blutbild zu erkennen. In der klinischen Chemie zeigen sich im Sinne des erhöhten Zellumsatzes erhöhte LDH- und Harnsäurewerte (65, 69). In einer italienischen Studie wurden

## Literaturdiskussion

stark erhöhte CD34-positive Zellen im peripheren Blut gefunden, die zusätzlich mit einer schlechteren Lebenserwartung assoziiert waren (70). Dies konnte aber in weiteren Studien nicht nachgewiesen werden (65, 71).

Entscheidend für die Diagnose der PMF ist die Knochenmarkspunktion. Nur dort kann die Fibrose festgestellt werden. In der präPMF zeigt sich eine Proliferation und Atypie der Megakaryozyten, ohne, dass eine Retikulinfaservermehrung nachweisbar ist. Zusätzlich zeigen sich Vorstufen der Granulopoiese und Erythropoiese mit Linksverschiebung und Dysplasien. Bei der overt fibrotic PMF liegt schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Fibrose ( $\geq$  Grad 2) des Knochenmarks vor (1, 69). Zur genaueren Beschreibung der Myelofibrosegade siehe auch Tabelle 10.

Tabelle 10: Grade der Myelofibrose nach Arber et al. (1)

---

### Myelofibrosis grading

<b>MF-0</b>	Scattered linear reticulin with no intersections (crossovers) corresponding to normal BM
<b>MF-1</b>	Loose network of reticulin with many intersections, especially in perivascular areas
<b>MF-2</b>	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections, occasionally with focal bundles of thick fibers mostly consistent with collagen, and/or focal osteosclerosis*
<b>MF-3</b>	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections and coarse bundles of thick fibers consistent with collagen, usually associated with osteosclerosis*

---

Semiquantitative grading of BM fibrosis (MF) with minor modifications concerning collagen and osteosclerosis, Fiber density should be assessed only in hematopoietic areas; \*In grades MF-2 or MF-3 an additional trichrome stain is recommended.

Zusätzlich erfolgen wie bei PV und ET Analysen der Treiber-Mutationen (JAKV617F, CALR und MPL). Falls diese negativ ausfallen, sollte zusätzlich BCR-ABL1 ausgeschlossen werden. Zudem scheint die Bestimmung der als prognostisch relevant festgestellten Mutationen wie ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1/IDH2 oder SRSF2 sinnvoll (69).

Die Diagnostikkriterien der präPMF und overt fibrotic PMF sind noch einmal in Tabelle 11 und

Tabelle 12 aufgeführt.

## Literaturdiskussion

Die Myelofibrose kann sich auch aus einer PV oder ET entwickeln. Das Hauptkriterium dieser Post-PV oder –ET-Myelofibrose ist eine bekannte Erkrankung an PV oder ET in der Vorgeschichte mit nun neu aufgetretenem Nachweis einer Myelofibrose. Ohne die vorherige Dokumentation der PV oder ET kann auch histologisch nicht von einer PMF unterschieden werden. Zu den Diagnosekriterien siehe Tabelle 13 und Tabelle 14.

Tabelle 11: WHO Kriterien der präPMF nach Arber et al. (1)

---

### WHO prePMF criteria

#### Major criteria

1. Megakaryocytic proliferation and atypia, without reticulin fibrosis .grade 1, accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis
2. Not meeting the WHO criteria for BCR-ABL1 CML, PV, ET, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
3. Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker,† or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis‡

#### Minor criteria

Presence of at least 1 of the following, confirmed in 2 consecutive determinations:

a. Anemia not attributed to a comorbid condition

b. Leukocytosis  $\geq 11 \times 10^9/L$

c. Palpable splenomegaly

d. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range

Diagnosis of prePMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion

†In the absence of any of the 3 major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (eg, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) are of help in determining the clonal nature of the disease; ‡Minor (grade 1) reticulin fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies.

Tabelle 12: WHO Kriterien der overt PMF nach Arber et al. (1)

---

### WHO overt PMF criteria

---

## Literaturdiskussion

### Major criteria

1. Presence of megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2 or 3
2. Not meeting WHO criteria for ET, PV, BCR-ABL1 CML, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
3. Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker,† or absence of reactive myelofibrosis‡

### Minor criteria

Presence of at least 1 of the following, confirmed in 2 consecutive determinations:

- a. Anemia not attributed to a comorbid condition
- b. Leukocytosis  $\geq 11 \times 10^9/L$
- c. Palpable splenomegaly
- d. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range
- e. Leukoerythroblastosis

Diagnosis of overt PMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion

†In the absence of any of the 3 major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (eg, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) are of help in determining the clonal nature of the disease; ‡BM fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder, or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies

Tabelle 13: WHO Kriterien Post-PV-MF modifiziert nach Grieshammer et al. (69)

### WHO Kriterien Post-PV-MF

#### Erforderliche Kriterien

Dokumentation der vorausgegangenen Diagnose PV nach WHO Kriterien

Knochenmarkfibrose Grad 2 bis 3 (auf einer Skala 0 bis 3) Grad 3 bis 4 (auf einer Skala 0 bis 4)

#### Zusätzliche Kriterien (zwei erforderlich)

Anämie<sup>1</sup> oder nicht mehr erforderliche Aderlasstherapie (ohne zytoreduktive Therapie) oder nicht mehr erforderliche zytoreduktive Therapie zur Reduktion der Erythrozytose

### Leukoerythroblastisches Blutbild

Zunehmende Splenomegalie (definiert entweder als Zunahme einer vergrößerten Milz von >5 cm unterhalb des linken Rippenbogens oder als neu diagnostizierte palpable Milzvergrößerung)

Entwicklung von 2 oder allen 3 der folgenden konstitutionellen Symptome: >10% Gewichtsverlust in 6 Monaten, Nachtschweiß, ätiologisch ungeklärtes Fieber (>37,5 Grad Celsius)

---

<sup>1</sup>unterhalb der Referenzwerte für Alter, Geschlecht und Anpassung an die entsprechende Höhe über dem Meeresspiegel

Tabelle 14: WHO Kriterien Post-ET-MF modifiziert nach Griebshammer et al. (69)

---

### WHO Kriterien Post-ET-MF

#### Erforderliche Kriterien

Dokumentierte Diagnose einer PV oder ET gemäß den WHO Kriterien

Knochenmarkfibrose Grad 2 bis 3 gemäß der europäischen Definition auf einer 0-III-Skala

#### Zusätzliche Kriterien (zwei erforderlich)

Anämie oder ein kontinuierlicher Hb-Abfall  $\geq 2$  g/dl vom Ausgangswert

Leukoerythroblastisches Blutbild

Palpable Splenomegalie  $\geq 5$ cm, oder neu aufgetretene palpable Splenomegalie

Erhöhte LDH

Neu aufgetretene konstitutionelle Symptome (2 bis 3 von folgenden Symptomen): >10% Gewichtsverlust in 6 Monaten, Nachtschweiß, ungeklärtes Fieber >37,5 °C

---

### 2.1.8.3 Risikostratifikation

Die Lebenserwartung ist wie oben bereits erwähnt bei Patient\*innen mit PMF reduziert. Deshalb werden die Patient\*innen einzelnen Risikogruppen zugeordnet, um sie individueller und damit besser behandeln zu können.



## Literaturdiskussion

---

Es gibt verschiedene Prognosescores, in den deutschen Leitlinien werden „international prognostic scoring system (IPSS)“, „dynamic international prognostic scoring system (DIPSS)“, sowie der DIPSS+ verwendet. Weitere Scores, wie der GIPSS oder MIPSS70+ wurden zwar schon veröffentlicht, finden noch keine breite Verwendung in Deutschland, werden allerdings auf internationaler Ebene empfohlen (69, 72). Der IPSS wird nur zu Diagnosezeitpunkt bestimmt, mit dem DIPSS kann man zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung eine Risikostratifikation durchführen.

In die Prognose-Abschätzung gehen das Alter, das Vorhandensein von konstitutionellen Symptomen, Hb (dieser wird im DIPSS im Unterschied zum IPSS anders gewichtet), Leukozyten, sowie der Blastenanteil im peripheren Blut ein. Beim DIPSS+ spielt zusätzlich das Vorhandensein eines ungünstigen Karyotyps, die Thrombozytenzahl, sowie der Transfusionsbedarf von Erythrozyten eine Rolle.

Beispielhaft wird hier nun der IPSS, als wichtigster und noch immer am meisten genutzter Score, dargestellt. Der DIPSS und DIPSS + finden sich detaillierter im Anhang.

Der IPSS-Score berücksichtigt folgende Einflussfaktoren auf das Überleben mit je einem Punkt:

- Alter >65 Jahre
- Konstitutionelle Symptome: Fieber, Gewichtsverlust >10% im Jahr vor Diagnosestellung, Nachtschweiß von >1 Monat Dauer
- Hb <10g/dl
- Leukozyten >25 G/l
- Blasten im peripheren Blut  $\geq 1\%$

Die daraus addierten Punkte werden dann wie folgt aufgeschlüsselt:

- 0 Punkte: low risk
- 1 Punkt: intermediate-1
- 2 Punkte: intermediate-2
- $\geq 3$  Punkte: high risk

### 2.1.9 Therapie und Prognose

Die Therapie der MPN erfolgt angepasst an ihre Risikostratifikation, Ausnahme hierzu ist die CML. Ziel ist es die Symptombelastung zu reduzieren, sowie

Komplikationen der Erkrankungen vorzubeugen, und damit auch die Prognose der Patient\*innen zu verbessern. Sinnvoll ist eine regelmäßige Evaluation der Patient\*innen (2, 52, 59, 69).

### 2.1.9.1 Kurative Therapie

Die einzig kurative Therapie der MPN stellt die allogene Stammzelltransplantation dar. Sie ist indiziert bei PMF-Patient\*innen mit höherem Risiko (sprich high risk und intermediate-2), allerdings nur in Einzelfällen der PV und nicht in ET (52, 69). Berücksichtigt man molekulare und zytogenetische Marker, können ca. 25% aller low risk oder intermediate-1 Patient\*innen einer höheren Risikogruppe zugeordnet werden. Für diese sollte dann ebenfalls eine allogene Stammzelltransplantation diskutiert werden, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

Einteilung in Intermediate-1 und mindestens ein Punkt folgender Aufzählung:

- Refraktäre transfusionsabhängige Anämie
- >2% Blasten im peripheren Blut
- Hochrisikozytogenetik oder Triple- negative MF oder ASXL1-Mutation

Diese Zusatzkriterien finden sich auch in den oben besprochenen neueren Risiko-Scores wieder (69, 72).

In Studien konnte eine Verlängerung des Überlebens durch eine allogene Stammzelltransplantation festgestellt werden, allerdings wurde noch keine randomisiert kontrollierte Studie im Vergleich zu Symptom-basierter Therapie durchgeführt. Es handelte sich lediglich um retrospektive Studien (72, 73).

Auch für die CML stellt die allogene Stammzelltransplantation eine Option dar. Wie bei der PMF wird diese allerdings nicht als Erstlinientherapie eingesetzt: Die Kriterien dazu sind in Tabelle 15 aufgeführt. In der chronischen Phase lassen sich bessere Ergebnisse erzielen als in fortgeschrittenen Phasen, weshalb vor der Stammzelltransplantation die Induktion einer chronischen Phase vorteilhaft ist (18, 51).

Tabelle 15: Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation in CML modifiziert nach Hochhaus et al.(18)

---

Nach Diagnose (initial)	Patient*innen mit akzelerierter Phase (AP) oder
-------------------------	---

---

Blastenkrise (BK)

Vorbehandlung mit TKI

Bei TKI-Versagen

Patient\*innen nach Progress in AP oder BK<sup>1</sup>

Patient\*innen mit T315I-Mutation

Bei Versagen Zweitlinien- TKI

Alle geeigneten Patient\*innen

---

<sup>1</sup>Vorbehandlung mit alternativem Inhibitor wird empfohlen

### 2.1.9.2 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie stellt die Basis einer Therapie der MPN dar. Vor allem bei Patient\*innen, die zu niedrigen Risikogruppen zählen, können sie Symptome lindern, und sogar das Überleben verlängern. Folgend sind die verschiedenen Entitäten aufgeführt.

**Allgemeine Maßnahmen** – Zunächst sollten Patient\*innen im Durchführen von *allgemein gesundheitsfördernden Maßnahmen* bestärkt werden. Dazu zählen Gewichtsreduktion, regelmäßige Bewegung, das Vermeiden von Exsikkose und langem Sitzen, sowie das Beenden eines bestehenden Nikotinkonsums. Vor allem mit Letzterem könnte es auch zur Wirkabschwächung der notwendigen Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) kommen (74). Zusätzlich ist auf Maßnahmen zur Vermeidung von Thrombosen, sowie auf deren Frühsymptome hinzuweisen, damit eine möglichst frühzeitige Behandlung derselbigen gewährleistet ist. Auch weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren müssen behandelt werden. Diese Punkte gelten insbesondere für die stark thrombogenen Erkrankungen PV und ET (59, 62).

**Watch and wait** – Sowohl bei Patient\*innen, die an PMF, aber auch an ET leiden kann eine aktive Therapie unterlassen werden. Grundlegend dafür sind aber das Fehlen von Splenomegaliebedingten Symptomen, sowie konstitutionellen oder anderen, durch ET oder PMF hervorgerufenen Beschwerden. Zusätzlich müssen die Patient\*innen den niedrigen Risikogruppen zugeordnet werden können: low risk oder intermediate-1 bei PMF, low risk bei ET (59, 69).

**Acetylsalicylsäure** – Sofern keine Kontraindikationen, wie beispielsweise eine hämorrhagische Diathese oder ein gastrointestinales Ulkusleiden, gegen eine Einnahme von ASS sprechen, sollte dieses in einer niedrigen Dosis zur Hemmung der Thrombozytenaggregation eingesetzt werden. ASS führt neben der

Thromboseprophylaxe zur Reduktion mikrovaskulärer Symptome. Während der Behandlung muss aber immer die Thrombozytenzahl kontrolliert werden: Steigt diese auf  $> 1 \text{ Mio./}\mu\text{l}$  an, muss eine Therapie mit ASS bis zur Normalisierung der Thrombozytenzahl pausiert werden, um eine erhöhte Blutungsneigung im Rahmen eines erworbenen von Willebrand-Syndroms zu verhindern. Indiziert ist ASS bei allen Risikogruppen der PV, sowie bei Patient\*innen mit ET. Bei letzteren wird eine genauere Indikation, sowie die Dosis aktuell allerdings noch erforscht; der jetzige Einsatz stützt sich vor allem auf Daten von PV-Patient\*innen (52, 55, 59, 62).

**Aderlass** – Bei allen an PV erkrankten Patient\*innen wird initial ein therapeutischer Aderlass bis zur Einstellung eines Hämatokrit von unter 45% durchgeführt. Dies senkt die Thromboembolierate, aber auch das kardiovaskuläre Risiko und die Mortalität an thromboembolischen Ereignissen (75, 76). Die Frequenz der Aderlasstherapie wird nach erstmaliger Einstellung individuell dem Hämatokrit des Patient\*innen angepasst, ein entstehender Eisenmangel ist gewünscht, und wird nur in ausgewählten Situationen substituiert (52, 55).

**Anämie** – Die Anämie ist ein klassischer Umstand in PMF. Diese wird zunächst mit *Transfusionen* therapiert. Sollte dies allerdings ein dauerhafter Zustand bleiben, kann zusätzlich eine Therapie mit *Erythropoietin* (EPO) eingeleitet werden. Ob dies allerdings zum Erfolg führt, wird in verschiedenen Quellen unterschiedlich bewertet. Die deutsche Leitlinie empfiehlt eine EPO-Substitution, in ca. 20- 25% tritt eine komplette Remission ein. Weiterhin können Danazol, ein Gonadotropinhemmer, oder Kortikosteroide, wenn eine Autoimmun-Hämolyse vorliegt, eingesetzt werden. Falls eine Therapie mit Danazol versagt, können zusätzlich zu dem Kortikosteroid Prednisolon Thalidomid oder Lenalidomid verabreicht werden (69, 72).

**Splenektomie und Milzbestrahlung** – Kommt es auch unter zytoreduktiver Therapie nicht zu einer Verbesserung der Splenomegalie-assoziierten Symptome, kann sowohl bei fortgeschrittenen PV-, als auch bei PMF- Patient\*innen eine Behandlung der Milz in Betracht gezogen werden. Eine Entfernung oder Bestrahlung kann vorübergehend für eine Besserung von Druckgefühl, Anämie oder portaler Hypertonie sorgen, verbessern aber nicht das Überleben der Patient\*innen. Hinzu kommen die hohen Risiken der Behandlung an sich, wie ausgeprägte Zytopenien nach einer Bestrahlung, oder die erhöhte perioperative Mortalität bei Milz-Eingriffen.

Demnach sind die Anwendung von Splenektomie und Bestrahlung kritisch und individuell zu diskutieren (52, 69, 72).

**Thrombozytapherese** – In seltenen Fällen der ET, wenn Patient\*innen eine exorbitant hohe Thrombozytenzahl aufweisen, kann eine Apherese erfolgen. Dies ist nur in starken oder lebensbedrohlichen Fällen von Organdysfunktion oder einer akuten Blutung, ausgelöst durch ein erworbenes von Willebrandt Syndrom, indiziert, und sollte immer von zytoreduktiver Therapie gefolgt werden. Zu dieser Therapieoption existieren aber noch keine randomisiert kontrollierten Studien (62).

### 2.1.9.3 Zytoreduktive Therapie

Eine zytoreduktive Therapie wird generell bei Patient\*innen eingesetzt, die einer höheren Risikogruppe zuzuordnen sind und im Falle der CML als primäre Therapie. Ziel ist es Erythro-, Thrombo- und Leukozytose zu vermindern, und damit Thrombosen oder anderen krankheitsassoziierten Symptomen vorzubeugen, sowie im besten Fall das Risiko einer Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML) zu senken, zumindest aber nicht zu erhöhen. Ein alleiniger Einsatz der zytoreduktiven Therapie ist dabei aber nicht vorgesehen, vielmehr erfolgt der Einsatz weiterhin auf Basis der oben genannten symptomatischen Therapie. Welche Substanz dabei eingesetzt wird, ist abhängig von den Subtypen der MPN und durch die weitere Forschung zu Tyrosinkinaseinhibitoren, so wie beispielsweise Ruxolitinib, stark im Wandel.

**Hydroxyurea** – Hydroxyurea oder auch Hydroxycarbamid (HU) ist ein Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, welche mit der DNA einer Zelle interferiert. Damit ist es in der Lage, die sich ungebremst teilenden Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen und folglich auch das durch die erhöhte Thrombozytenzahl erhöhte Thromboserisiko effektiv zu senken. Zusätzlich lindert HU die Splenomegalie, Knochenschmerzen, Fieber und Juckreiz. Jedoch können unter der Therapie Zytopenien, Diarrhoe, mukokutane Ulzera, periphere Neuropathien, maligne Tumoren der Haut, und, in seltenen Fällen, Lungentoxizität auftreten. Zusätzlich wirkt HU teratogen, und ist damit in Schwangerschaften nicht einsetzbar (52, 55, 62, 72).

Vorrangig wird HU in der Therapie der PV bei Hochrisikopatient\*innen eingesetzt, sowie bei Niedrigrisikopatient\*innen, falls es zu einer Progression der Myeloproliferation, einem gesteigerten Risiko für Thromboembolien und Blutungen,

oder nicht kontrollierbaren Symptomen kommt. Parameter dazu sind folgend aufgeführt (52, 55, 62, 72):

Zeichen der Progression der Myeloproliferation sind:

- Zunahme der Milzgröße oder symptomatische Splenomegalie
- Thrombozytenanstieg auf  $> 1\ 000\ 000/\mu\text{l}$
- Leukozytenanstieg auf  $> 10\ 000/\mu\text{l}$  bis  $> 15\ 000/\mu\text{l}$
- Häufige bzw. zunehmende Aderlassfrequenz
- gesteigertes/ zunehmendes Risiko für Thromboembolien und Blutung und nicht kontrollierbare belastende klinische Symptome
- Im Verlauf neu aufgetretene Thromboembolien
- Hämorrhagische Komplikationen
- Mikrozirkulationsstörungen trotz Therapie mit ASS
- Eingeschränkte Durchführbarkeit von Aderlässen
- Symptomatischer Eisenmangel, der eine Fortführung der Aderlässe nicht erlaubt
- Unkontrollierter Hämatokritanstieg, falls Eisensubstitutionen unumgänglich sind
- Schwere bzw. den Patient\*innen belastende krankheitsbedingte Symptome

Auch in der ET findet HU Anwendung: Eingesetzt wird es bei high risk und intermediate risk Patient\*innen. Aufgrund seiner Nebenwirkungen wird jedoch noch diskutiert ab welchem Lebensalter der Patient\*innen HU indiziert ist, da es durch die Therapie nicht zu einer Verlängerung der Lebenserwartung kommt (59, 62).

In der Erstlinientherapie der PMF spielt HU keine Rolle. Als eine Alternative wenn allogene Stammzelltransplantation, Ruxolitinib oder Fedratinib nicht indiziert sind, stellt es allerdings eine Behandlungsoption dar (72).

HU kann auch Anwendung in der Therapie der CML in chronischer Phase finden. Es kann eingesetzt werden, wenn bei Patient\*innen eine Leukozytose ( $>100 \times 10^9$  Zellen/L), systemische Symptome oder eine symptomatische Splenomegalie festgestellt wird, eine endgültige Diagnose der CML aber noch aussteht. Zusätzlich kann HU auch als palliative Therapie verwendet werden (18, 51).

**Tyrosinkinaseinhibitoren** – Die Entdeckung des Wirkstoffes *Imatinib* sorgte für einen drastischen Umschwung in der Behandlung der CML. Imatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor (TKI), der als erster zur Therapie maligner Erkrankungen zugelassen wurde und eine Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur damaligen Therapie mit Interferon zeigte. Im Anschluss dessen wurden weitere

Tyrosinkinaseinhibitoren erforscht und schließlich *Nilotinib*, *Dasatinib* und *Bosutinib*, sowie *Ponatinib* zur Behandlung der CML zugelassen. Die zweite Generation unterscheidet sich zu Imatinib zum einen in höheren Raten der Induktion zytogenetischer und molekularer Remissionen und einer Reduktion des Fortschreitens der CML, andererseits aber auch im Nebenwirkungsspektrum: So treten unter Nilotinib zum Beispiel häufiger kardiovaskuläre Ereignisse, hyperglykämische Stoffwechsellagen sowie Beeinträchtigungen des Lipidstoffwechsel auf als unter Imatinib. Flüssigkeitsretention und Muskelkrämpfe, die eine Therapie mit Imatinib häufig begleiten, wurden seltener beobachtet. In Patient\*innengruppen unter Therapie mit Dasatinib zeigten sich häufig Pleuraergüsse, Thrombozytopenien, Neutropenien und Anämien, Bosutinib zählt Lebertoxizität und Diarrhoen zu seinen Nebenwirkungen. Insgesamt ist bei den TKIs zu beachten, dass sie alle die QT-Zeit verlängern (18, 51).

In der Therapie der chronischen Phase der CML muss nun anhand der Nebenwirkungen abgewogen werden, welcher der TKIs, mit Ausnahme von Ponatinib, eingesetzt wird. Sollte eine Resistenz, ein unzureichendes Ansprechen oder eine Intoleranz gegen die Initialtherapie auftreten, erfolgt ein Wechsel des TKI zu einem anderen der zugelassenen. Ponatinib wird lediglich bei Versagen des Erstlinien-TKIs und der Feststellung der T315I Mutation eingesetzt (18, 51).

Auch in der akzelerierten Phase und Blastenkrise der CML werden TKIs eingesetzt: Zuvor muss aber abgeklärt werden, ob und welches TKI schon verwendet wurde, dieses scheidet dann zur weiteren Behandlung aus. Zudem kann in der Blastenkrise, zusätzlich zum Einsatz eines zugelassenen TKI, konventionelle Chemotherapie, abhängig von der immunologischen Charakterisierung der Blasten, angewendet werden (18, 51)

*Ruxolitinib* ist ein Inhibitor der Januskinase 1 und 2 und gehört auch zur Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Aufgrund dieses Ansatzpunktes scheint es besonders geeignet, um Patienten mit JAK2 Mutationen zu behandeln, allerdings erzielt es auch Effekte unabhängig vom Mutationsstatus, weshalb auch eine Wirkweise unabhängig von der Januskinase angenommen wird. Näheres dazu siehe unter Kapitel 2.2.1 (72).

Die Zulassung zur Behandlung der PMF erfolgte 2012. In den Studien COMFORT I und II wurde eine Reduktion der Splenomegalie und krankheitsassoziierter

Symptome nachgewiesen, eine Verlängerung des Überlebens der Patient\*innen ist im Moment aber noch umstritten (69, 72, 77-80). Der Einsatz erfolgt bei Patient\*innen, bei denen keine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden kann, aber eine Splenomegalie und weitere Symptome vorliegen. Allerdings werden in Folge der Behandlung Anämien, Thrombozytopenien und Infektionen beobachtet. Das Auftreten eines malignen Lymphoms konnte bei Patient\*innen aufgezeigt werden, die schon vor Ruxolitinib-Einnahme eine klonale B-Zell-Population aufwiesen (69, 72). Zu genaueren Informationen zu den Nebenwirkungen siehe auch Kapitel 2.2.3.

In der Therapie der PV wird Ruxolitinib erst als Zweitlinientherapie eingesetzt, wenn eine Behandlung mit Hydroxyurea nicht mehr toleriert wird oder nicht mehr wirksam ist. Die RESPONSE- Studie untersuchte die Effekte von Ruxolitinib im Vergleich zur besten verfügbaren Therapie (BAT). Zur BAT zählten HU, Interferon, Pipobroman, Anagrelide, Immunmodulatoren und das Ausbleiben einer Medikation. Dabei zeigten sich eine verminderte Notwendigkeit des Aderlass, eine bessere Reduktion der Splenomegalie, bessere Kontrolle von PV-assoziierten Symptomen, sowie ein selteneres Auftreten von thromboembolischen Ereignissen (52, 55, 81, 82).

Eine Zulassung in der Behandlung der ET erfolgte bisher nicht.

**Interferon alpha** – Pegyliertes Interferon alpha-2a (Peg-IFN $\alpha$ -2a) wird in PV, ET und PMF eingesetzt. Es ist ein natürlich vorkommender Modifikator von biologischen Reaktionen und hat anti-proliferative, pro-apoptotische, immunmodulierende und differenzierende Eigenschaften. Effektiv führt es zu besserer Kontrolle der Erythro- und Thrombozytose in PV und ET, reduziert die Milzgröße und kann, eingesetzt im Frühstadium der PMF, zu einer kompletten Remission führen. Zusätzlich wirkt es nicht teratogen, kann also in der Schwangerschaft verwendet werden. Allerdings gibt es keine Evidenz einer Verlängerung des Überlebens oder einer Verminderung des Risikos der Transformation in eine akute myeloische Leukämie (AML). Zusätzlich ist es mit Nebenwirkungen wie Erbrechen, Schwindel, Fieber, Unbehagen bis hin zu Kopfschmerz, Myalgien, Depression und Dyspnoe weniger tolerabel, und weniger wirtschaftlich als ein Einsatz von HU, weswegen der Einsatz in ET und PV nur als eine Alternative für junge Patient\*innen oder auch solche mit dem Risiko einer Schwangerschaft erfolgt (52, 55, 59, 62). Auch bei Versagen der initialen zytoreduktiven Therapie kann es eingesetzt werden: Yacoub et al. (83) beschreiben



positive Effekte bei Patient\*innen mit high risk ET und PV mit Auftreten einer HU-Resistenz. In PMF wurde es ebenfalls erfolgreich erprobt, in den deutschen Leitlinien wird es allerdings lediglich erwähnt (69, 84).

In der CML stellte Interferon jahrzehntelang die Erstlinientherapie dar. Heute kann es zusammen mit Imatinib eingesetzt werden, womit ein besseres molekulares Ansprechen erreicht werden kann (85). Auch die Kombination mit Dasatinib erzielt hohe Raten an molekularer Remission (86). Eine Kombination mit Nilotinib wird aktuell noch im Rahmen der TIGER-Studie (NCT01657604) erforscht.

**Weitere** – Zur Therapie der ET kann auch *Anagrelid* eingesetzt werden. Anagrelid ist ein orales Imidazoquinazolin-Derivat, das über die cAMP-Phosphodiesterase der Thrombozyten diese in ihrer Aggregation und deren Zahl verringert. Die ANAHYDRET-Studie hat Anagrelid mit HU verglichen und kam zu dem Ergebnis einer Äquieffektivität (87). Der Einsatz wird trotz des guten Potentials zur Senkung der Thrombozytenzahlen kritisch gesehen, da es zu Kardiotoxizität und einem Fortschreiten zur Post-ET-MF kommen kann (59, 62). In der Therapie von PV und PMF wird es nicht mehr eingesetzt, vor allem, da es in ersterem zu erhöhter Blutungsneigung, Risiko von arteriellen Thrombosen und einer Progression zur Myelofibrose gekommen ist (55).

*Pipobroman* und *Busulfan* sind beides alkylierende Substanzen, die in der Therapie der PV eingesetzt werden können. Aufgrund ihrer hohen Toxizität wird Pipobroman aber gar nicht mehr, oder nur noch wie Busulfan bei älteren Patient\*innen als sekundäres Therapeutikum empfohlen. Die Toxizität spiegelt sich wider in einer Assoziation mit Transformation zur AML, Progression zur Myelofibrose, oder gar einer Verkürzung der Lebenserwartung der Patient\*innen (52, 55).

### 2.1.9.4 Prognose

Das Gesamtüberleben der Patient\*innen wird anhand von Prognosescores berechnet. Deren Grundlage stellen die bereits in der jeweiligen Risikostratifikation genannten Scores dar. Allerdings beziehen sich beispielsweise die Risikostratifikationen der PV und ET, die oben genannt werden, auf das Risiko eine Thrombose zu erleiden und nicht auf das Überleben der Patient\*innen. Somit wurden in Studien andere Parameter herangezogen, um das Überleben der Patient\*innen einordnen zu können.

## Literaturdiskussion

---

Das Gesamtüberleben der Patient\*innen mit *PV* ist, auch wenn die Erkrankung adäquat behandelt wird, im Vergleich zur gleichaltrigen und geschlechtsadaptierten Population erniedrigt. Zusätzlich zu den Kriterien Alter und venöse Thrombosen in der Vergangenheit, wurde in einer Studie von Tefferi et al. (53) Leukozytose  $\geq 15.000/\mu\text{l}$  hinzugefügt. Dann wurden wie folgt Punkte vergeben:

- Alter:  $\geq 67$  Jahre: 5 Punkte; 57 bis 66 Jahre: 2 Punkte
- Leukozytose:  $\geq 15.000/\mu\text{l}$ : 1 Punkt
- Venöse Thrombosen in der Vergangenheit: 1 Punkt

Anhand der Punktzahlen wurde dann in Risikogruppen eingeteilt und deren medianes Überleben berechnet: So liegt das mediane Überleben der low risk Gruppe (0 Punkte) bei 28 Jahren, der intermediate risk Gruppe (1 bis 2 Punkte) bei 19 Jahren, und das der high risk Gruppe ( $\geq 3$  Punkte) bei 11 Jahren.

Die *ET* verkürzt das Leben der meisten Patient\*innen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Patient\*innen nicht. Die Prognoseabschätzung erfolgt mit dem IPSET wie oben beschrieben, allerdings liegen nur Daten zum Überleben vor, die sich auf den IPSET von 2012 nach Passamonti et al. (88) beziehen. Die Aufteilung der Patient\*innen erfolgte unter den Gesichtspunkten Alter  $\geq 60$  Jahre (2 Punkte), Leukozytenzahl  $\geq 11.000/\mu\text{l}$  (1 Punkt) und Thrombosen in der Vergangenheit (1 Punkt). Wiederum führten die vergebenen Punkte zu Risikogruppen, bei denen wie folgend das mediane Überleben bestimmt wurde:

- Low risk (0 Punkte): kein Erreichen des Endpunktes
- Intermediate risk (1 bis 2 Punkte): 24,5 Jahre
- High risk (3 bis 4 Punkte): 13,8 Jahre

Weitere Studien, die andere Parameter heranzogen, kamen auf gleiche oder leicht erniedrigte Überlebenschancen (62, 89, 90) .

Bei *PMF* stimmen die Risikostratifikation, nach der die Therapie ausgewählt wird, und die, die das Überleben abschätzt, überein. Wie oben dargestellt gehen in die Prognose-Abschätzung Alter, Vorhandensein von konstitutionellen Symptomen, Hb (dieser wird im DIPSS im Unterschied zum IPSS anders gewichtet), Leukozytenzahl, sowie der Blastenanteil im peripheren Blut ein. Beim DIPSS+ spielt zusätzlich das Vorhandensein eines ungünstigen Karyotyps, die Thrombozytenzahl, sowie der

Transfusionsbedarf von Erythrozyten eine Rolle. In Tabelle 16 wird das mediane Überleben nach IPSS dargestellt, das nach DIPSS+ ist im Anhang beigefügt.

Tabelle 16: Prognostische Einteilung des IPSS-Scores nach Grieshammer et al. (69)

Prognosegruppe	Mediane Überlebenszeit (Monate)
Low risk	135
Intermediate risk 1	95
Intermediate risk 2	48
High risk	27

Das Überleben der Patient\*innen, die an einer *CML* leiden, hat sich in den letzten Jahren immer weiter an das der Normalbevölkerung angepasst. Zum Abschätzen des Überlebens gibt es verschiedene Scores, von denen heute üblicherweise der 2016 vorgestellte EUTOS-Long Term Survival (ELTS)-Score verwendet wird. Er bezieht das Alter der Patient\*innen zu Diagnosestellung, die Milzgröße, die Thrombozytenzahl und den Anteil der Blasten im Blut in die Beurteilung der Prognose mit ein, verrechnet sie mit verschiedenen Faktoren (siehe dazu Tabelle 18) und summiert diese Werte (91-93). Daraus ergibt sich wiederum eine Unterteilung in Risikogruppen:

- Low risk ( $\leq 1,5680$  Punkte)
- Intermediate risk (1,5680 bis 2,2185 Punkte)
- High risk ( $> 2,2187$  Punkte)

Es ergeben sich folgende Daten zum Überleben:

Tabelle 17: Prognose der CML nach ELTS modifiziert nach Pfirrmann et al. (91) und Hochhaus et al. (92)

	Low risk	Intermediate risk	High risk
10- year OS [%]	88	79	68
6-year LRD [%]	2	5	12

Tabelle 18: Faktoren des ELTS nach Pfirrmann et al. (91)

<b>Factors</b>	<b>Coefficient</b>
$(\text{Age in years} / 10)^3$	0,0025
Spleen size. Cm below costal margin	0,0615
Blasts, % in peripheral blood	0,1052
$(\text{Platelet count} \times 10^9 / \text{l} / 1000)^{-0,5}$	0,4104

## 2.2 Ruxolitinib

*Ruxolitinib* gehört zu den Proteinkinaseinhibitoren (PKI), eine der wichtigsten Gruppen in der medikamentösen zielgerichteten Therapie der Onkologie. Diese sind in Begriff die zumeist noch als Erstlinienmedikamente eingesetzten Chemotherapeutika abzulösen. Den bisher am erfolgreichsten eingesetzte Wirkstoff dieser Gruppe stellt Imatinib dar, der 2001 zu einer Revolution in der Therapie der CML geführt hat. Außerdem bahnen sich die PKIs einen Weg in nicht-onkologische Bereiche, Zulassungen erfolgten beispielsweise in der Therapie der rheumatoiden Arthritis und der idiopathischen Lungenfibrose. Allen PKIs ist der Wirkmechanismus gleich: Sie verdrängen ATP aus der Bindungsstelle der Kinasen, verhindern somit eine Phosphorylierung der Zielproteine und schalten Downstream-Signale ab. Der überwiegende Anteil der PKIs sind, wie auch Ruxolitinib, Tyrosinkinaseinhibitoren. Zusätzlich gibt es aber auch Serin/Threoninkinaseinhibitoren, Lipidkinaseinhibitoren, sowie Multikinaseinhibitoren (94, 95).

### 2.2.1 Wirkmechanismus

Ruxolitinib ist ein gleichwertiger Inhibitor von JAK1 ( $IC_{50} \sim 3,3nM$ ) und JAK2 ( $IC_{50} \sim 2,8nM$ ). Zusätzlich findet in höheren Konzentrationen in vitro eine Hemmung von TYK2 (~6-fache Konzentration) und JAK3 ( $\geq 130$ -fache Konzentration) statt. JAK1 ist an der Weiterleitung von Signalen von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt, JAK2 spielt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese (96).

Getestet an JAK2V617F-positiven Ba/F3-Zellen, einer klassischen Zellreihe zur Untersuchung unter anderem von JAK, wurde eine Reduktion der Zellproliferation, gesteigerte Apoptose, sowie eine Inhibition der Phosphorylierung von STAT3, STAT5, sowie „extracellular-signal regulated kinases“ (ERK) 1 und 2 nachgewiesen. Weiterhin erfolgt eine Inhibition der Proliferation erythroider und myeloischer Vorläuferzellen ex vivo im Blut von PV-Patient\*innen. Im Mausmodell, das JAK2V617F-getriggerte Malignität darstellt, erreichte Ruxolitinib eine Verkleinerung der Milz durch Verhinderung der histologischen Veränderungen derselben, die Reduktion von JAK2V617F-positiven Zellen und eine Verlängerung des Überlebens der Versuchstiere. Zusätzlich wurden die Spiegel von IL-6 und TNF-alpha, die in MPN an der Entstehung von konstitutionellen Symptomen beteiligt sind, verringert

(96-99). Wie bereits in 2.1.9.3 beschrieben konnte die Wirksamkeit beim Menschen in den COMFORT- und RESPONSE-Studien nachgewiesen werden (55, 66).

### **2.2.2 Indikationen**

Laut Fachinformation erfolgte die Zulassung für Ruxolitinib zur Behandlung krankheitsbedingter Splenomegalie oder Symptomen bei Erwachsenen mit primärer MF, aber auch Post-PV-MF oder Post-ET-MF. Zusätzlich wird es zur Behandlung von PV-Patient\*innen eingesetzt, die resistent oder intolerant gegenüber Hydroxyurea sind (5).

### **2.2.3 Nebenwirkungen**

Aufgrund der komplexen Verbindungen der einzelnen Komponenten des JAK/STAT-Signalweges und verschiedenster Komponenten des Immunsystems, scheint es nur nachvollziehbar, dass eine Inhibition der JAK entweder direkte oder indirekte immunologische Konsequenzen nach sich zieht (100). Zudem gehören Infektionen zu den Hauptursachen für Morbidität und Mortalität, zumindest in MF (101).

In einer systematischen Review von Lussana et al. (6) erfolgte die Untersuchung von Infektionen, die mit Ruxolitinib assoziiert waren und bis 2017 veröffentlicht wurden. Dort konnten erhöhte Zahlen von Herpes-Zoster-Infektionen, Bronchitiden, und Harnwegsinfekten gezeigt werden, außerdem kommen noch wenige, aber fatale Verläufe wie Sepsis und schwere Pneumonien hinzu. Zudem wurde eine Reaktivierung von Hepatitis B beschrieben (102). Einzelne Fallberichte dokumentieren zusätzliche Hepatitis B-Reaktivierungen, aber auch das Auftreten von Tuberkulose, Pneumocystis jirovecii-Infektionen, Cryptococcus neoformans-Pneumonitiden, bilaterale Toxoplasmose-Retinitis, progressive multifokale Enzephalopathie, assoziiert mit dem JC-Virus, CMV-Retinitis, und einen primären Leberabszess, entstanden durch eine Infektion mit Klebsiella pneumoniae (100, 103-107). Außerdem findet sich ein Bericht über einen Patienten mit Magenzulzera, in deren histologischer Aufarbeitung EBV nachgewiesen wurde, sowie ein Bericht über das Auftreten eines acute respiratory distress syndrome (ARDS) (108, 109). Polverelli et al. (110) stellten verschiedene Risikofaktoren zumindest bei Patient\*innen mit MF unter Ruxolitinib-Therapie heraus: So spielt das Alter der Patient\*innen ( $\geq 65$  Jahre) sowie ein high risk IPSS-Score zu Therapiebeginn, Hämoglobinwerte  $\leq 10$ g/dl, eine vorherige zytoreduktive Therapie und infektiöse

Komplikationen in der Vergangenheit der Patient\*innen eine wichtige Rolle. Die verabreichte Dosis der Ruxolitinib-Therapie korreliert allerdings nicht mit dem Infektionsrisiko (110).

Im Zuge dessen wurden auch Funktionen von Immunzellen daraufhin untersucht, inwieweit deren Zahl, aber auch Funktion von Ruxolitinib beeinflusst wird.

*Dendritische Zellen* (DC) sind Antigen-präsentierende Zellen (APC), die auch phagozytische Eigenschaften aufweisen. Mit der Präsentation der Antigene aktivieren sie naive T-Lymphozyten zur Differenzierung in T-Helferzellen und T-Effektorzellen nach Migration in den Lymphknoten. Zusätzlich sezernieren sie Zytokine, die ebenfalls Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem haben (7). In der Differenzierung der DCs spielen viele hämatopoietische Zytokine eine Rolle, wie beispielsweise Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor (GM-CSF) und TGF- $\beta$ . Zusätzlich wird deren Entwicklung und Funktion von STAT3 und verschiedenen Interferonen beeinflusst (100). Untersuchungen von Heine et al. (111) und Rudolph et al. (112) zeigen auf, dass es in Anwesenheit von Ruxolitinib in vitro zu einer Blockade der DC-Entwicklung kommt. Außerdem produzieren die DCs weniger IL-12, weniger kostimulatorische Moleküle zur Toll-like-receptor (TLR)-Stimulation und ähneln morphologisch und phänotypisch mehr Monozyten als DCs. Auch ihre Aktivierung in Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) wird durch Ruxolitinib verhindert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Einschränkungen des Primings, der Aktivierung und der Proliferation der T-Lymphozyten durch die DCs auftreten, zudem wird die virale Clearance verzögert. Zuletzt scheint die Migration der DCs beeinflusst.

Auch *Natürliche Killerzellen* (NK) werden von Ruxolitinib in ihrer Funktion beeinflusst. Sie sind die Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems und in der Lage Zellen, die mit Viren infiziert oder maligne sind, zu entdecken und zu lysieren. Zudem sind sie durch die Produktion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  an der Differenzierung von Zellen des erworbenen Immunsystems wie Th1-Zellen beteiligt und stoßen die Reifung von DCs an. Ihre eigene Differenzierung wird überwiegend von IL-15 und IL-2 über den JAK1-JAK3/STAT5-Weg reguliert (7).

Schönberg et al. (113) stellten in einer Studie von 28 MPN-Patient\*innen mit oder ohne Ruxolitinib-Therapie und 24 gesunden Proband\*innen den Einfluss von Ruxolitinib auf NK heraus: So ist die Zahl der NKs reduziert, was mit einem erhöhten

Risiko für klinisch relevanten Infektionen assoziiert ist. Dies beruht nicht auf einer Beeinflussung der Lebensfähigkeit der NKs, sondern auf einer Verhinderung der Ausreifung der Zellen durch eine Blockade des JAK/STAT-Signalweges. Dabei muss aber beachtet werden, dass schon das Vorhandensein der MPN einen Defekt der NKs auslöst, welcher durch die Gabe von Ruxolitinib zusätzlich weiter negativ beeinflusst wird. In vitro konnte auch gezeigt werden, dass die Funktion des Lysierens von Zielzellen beeinträchtigt wird, da das Ausbilden einer lytischen Synapse nicht mehr gewährleistet ist. Außerdem sind Funktionen wie die Degranulation und IFN- $\gamma$ -Produktion eingeschränkt. Diese Effekte sind aber nach Absetzen von Ruxolitinib reversibel (100).

Der JAK/STAT-Signalweg moduliert auch die Differenzierung von naiven und schon differenzierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (100). Durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, werden Zielzellen induziert und/oder rekrutiert. Zusätzlich können sich CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in verschiedene Stadien differenzieren, wie beispielsweise in regulatorische und T-Helferzellen. Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) unterdrücken autoreaktive Lymphozyten, schützen vor Autoimmunerkrankungen, kontrollieren und moderieren Inflammation durch die Produktion von inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Diese fördern Fibrose, induzieren Apoptose von T-Effektorzellen und beeinflussen deren Funktion (7, 114). So verwundert es nicht, dass Ruxolitinib auch T-Lymphozyten moduliert: Die Zahlen von Th1, Th17 und T<sub>reg</sub> in MPN sind verringert, da deren Differenzierung verhindert wird. Zusätzlich beeinträchtigt Ruxolitinib deren Zytokinproduktion (115). Dem entgegen steht die Beobachtung von Keohane et al (116), dass Th17-Zellen nach Ruxolitinib-Therapie vermehrt zu finden sind. Des Weiteren konnte in vivo und in vitro ein Silencing von T-Helferzellen, sowie die Blockade von proinflammatorischen Zytokinen dieser Zellen gezeigt werden. Massa et al. (117) beschreiben, dass die Zahl der zirkulierenden T<sub>reg</sub>, durch die Gabe von Ruxolitinib langfristig verringert bleibt, auch nach Absetzen der Medikation.



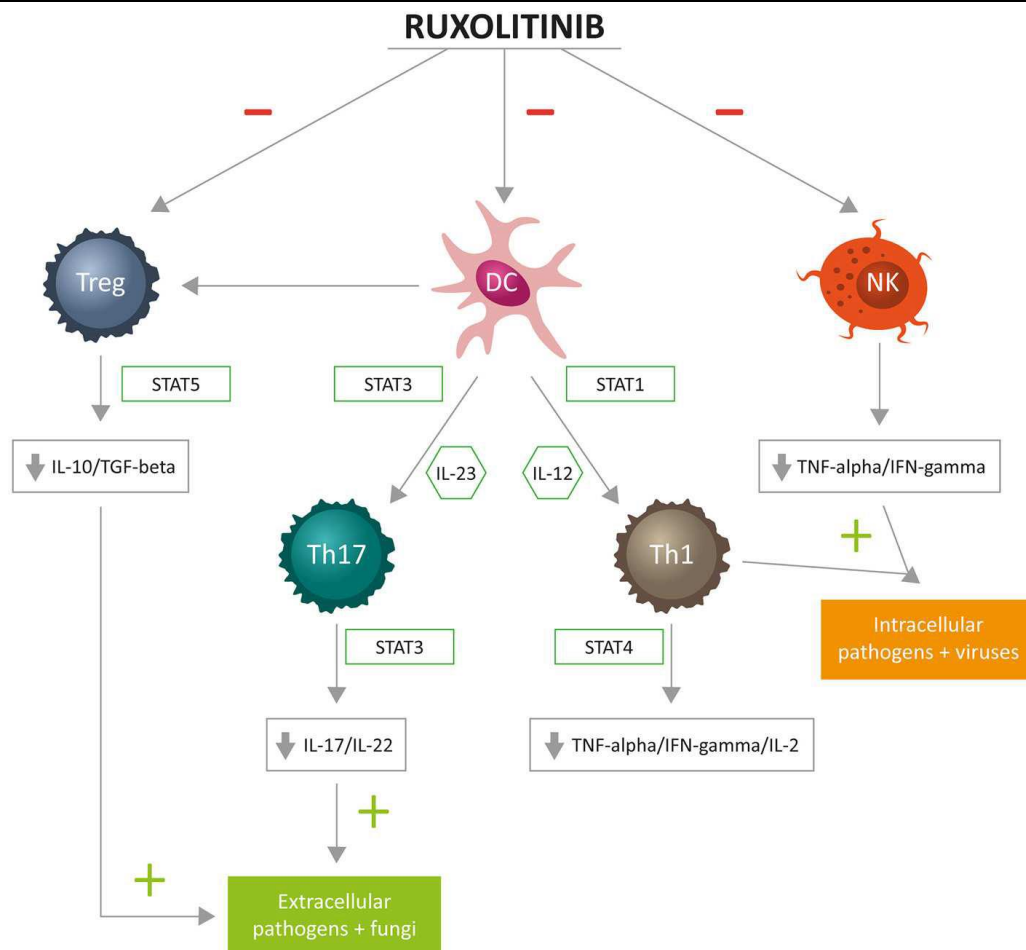


Abbildung 2: Der Einfluss von Ruxolitinib auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems aus Elli et al.(7)

Zusammenfassend wird der Einfluss von Ruxolitinib auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems noch einmal in Abbildung 2 gezeigt.

Neben den Effekten auf die Zellen des Immunsystems bleibt aber weiterhin als häufigste Nebenwirkung eine Myelosuppression: Patient\*innen zeigen Anämien, Thrombozytopenien und Neutropenien. Dies führte in den Zulassungsstudien allerdings nur in den seltensten Fällen zum Abbruch der Therapie mit Ruxolitinib (5). Außerdem kam es gehäuft zu Blutungen, welche sich vor allem in der erleichterten Bildung von Hämatomen bei Bagateltraumata darstellten. Allerdings wurden auch intrakranielle und gastrointestinale Blutungen erfasst (5). Zudem wurden erhöhte Lipasewerte, sowie erhöhte systolische Blutdrücke beschrieben (5)

## **2.3 Das angeborene Immunsystem**

Die Aufgabe des Immunsystems ist es den Körper vor Krankheiten zu bewahren. Es wird eingeteilt in das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Fremdstoffe dar. Die wichtigsten zellulären Akteure sind die neutrophilen Granulozyten, wegen ihrer Kernmorphologie auch polymorphonukleäre Granulozyten (PMN) genannt, und die Monozyten, die beide phagozytotische Aktivitäten aufweisen (8). Wie oben beschrieben treten bei der Einnahme von Ruxolitinib häufig auch Infektionen auf, zudem konnte bei einigen Immunzellen Funktionseinschränkungen beobachtet werden. Aus diesem Grund erscheint auch die Funktion der neutrophilen Granulozyten in diesem Zusammenhang interessant. Zum besseren Verständnis von Einschränkungen in den Funktionen der PMN sind hier die physiologischen Vorgänge dieser Zellen dargestellt.

### **2.3.1 Neutrophile Granulozyten**

#### **2.3.1.1 Auswanderung und Aktivierung**

Mit ca. 60% der Leukozyten, stellen die PMN den größten Anteil an peripher zirkulierenden weißen Blutkörperchen dar. Zusätzlich existieren sogenannte „marginated neutrophil pools“, also Sammlungen von Neutrophilen an Endothelien, Milz, Leber, Knochenmark und der Lunge, die, bei Bedarf, mobilisiert werden können. Die Bedeutung derer im Menschen ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Die Freisetzung und sowie deren Unterdrückung steht durch Chemokine, die von den Stromazellen des Knochenmarks produziert werden, im Gleichgewicht (118, 119).

Um zu ihrem Einsatzort zu gelangen, ist es zunächst notwendig, dass sich die PMN an das Endothel der venösen Gefäßwand anlagern. Dies geschieht, unterstützt durch die verminderte Blutströmungsgeschwindigkeit, mit Hilfe von P- und E-Selektinen auf den Endothelzellen. Sie binden an die P- und E- selectin glycoprotein ligand 1 (P/ESGL1) an den Neutrophilen, sodass diese an der Gefäßwand entlang „rollen“. Zu einer Verstärkung der Bindung führen schließlich die L-Selektine in Interaktion mit PSGL1. Zusätzlich wird dadurch die Bindung weiterer PMN ermöglicht. Weiterhin wird der Prozess des „slow rolling“, also eine noch festere Bindung an das Endothel, durch Interaktion von  $\beta$ 2-Integrinen (unter anderem CD11b/CD18) vermittelt.

Schließlich erfolgt die Diapedese durch die, und zwischen den Endothelzellen hindurch (118-121).

Gleichzeitig zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten erfolgt deren Aktivierung. Inflammatorische Zytokine aktivieren das Endothel, sodass dieses platelet-activating factor (PFA), TNF $\alpha$ , Leukotrien B<sub>4</sub>, bakterielle Peptide und einige andere Chemokine freisetzt. Weitere Chemokine, insbesondere IL-8, werden aus Endothelzellen und den Neutrophilen selbst ausgeschüttet. Durch Bindung an ihren extrazellulären Rezeptoren und der folgenden Aktivierung intrazellulärer Signalwege kommt es zur Konformationsänderung der Integrine, sodass diese ihre höchste Affinität aufweisen und bestmöglich die Bindung zwischen Granulozyten und Endothel vermitteln (118-120). Diese Vorgänge stellen allerdings keine Einbahnstraße dar: Zeitgleich erfolgen Zyklen von Aktivierung und Inaktivierung. Dies allein ist zur Aktivierung aber noch nicht ausreichend: Am Ort der Inflammation selbst, folgt ein zweiter Aktivierungsschritt (118).

Um die Funktionen der PMN ausspielen zu können, müssen verschiedene unspezifische Oberflächenrezeptoren mit dem Fremdartigen oder einem Opsonin, das an den Fremdstoff bzw. das Pathogen bindet, interagieren. Zu diesen Rezeptoren gehören Fc $\gamma$ -Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren, Scavenger-Rezeptoren, Lektine und Toll-like- und Nod-like Rezeptoren (119, 120).

Der *Fc $\gamma$ -Rezeptor* bindet an die Fc-Region des IgG. So können IgG-opsonierte Partikel und Antigene erkannt und nach Polymerisation des Aktinzytoskeletts internalisiert werden. Dieses Prinzip setzt sich bei den *Komplementrezeptoren* fort, nur dass hier Partikel durch das Komplementsystem markiert wurden, und je nach Komplementfaktor von einem der drei verschiedenen Komplementrezeptoren gebunden werden. *Scavenger-Rezeptoren* und *Lektine* erkennen Teile des Pathogens selbst: So binden Scavenger-Rezeptoren Lipoproteine, Polyribonukleotide und LPS, Lektine differenzieren zwischen körpereigenen und -fremden Kohlenhydraten, um Mikroben zu erkennen. *Toll-like-* und *Nod-like-Rezeptoren* erkennen Produkte von Mikroorganismen und sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), zu denen auch LPS und Zymosan gehören. Hier wird allerdings durch Bindung keine Phagozytose eingeleitet (119, 120).

### 2.3.1.2 JAK/STAT-Signaling

Aufgrund seiner Vielzahl an Rezeptoren ist auch eine Vielzahl an Signalkaskaden an der physiologischen Funktion der neutrophilen Granulozyten beteiligt. Diese sind zu zahlreich, um sie in dieser Arbeit aufzuführen, deswegen wird an dieser Stelle auf eine Review von Futosi et al. (9) verwiesen. Hier wird lediglich auf den JAK/STAT-Signalweg eingegangen, da dieser durch Ruxolitinib beeinflusst wird.

Der JAK/STAT-Signalweg, zwischen 1989 und 1994 entdeckt, wird als einer der zentralen Knotenpunkte der intrazellulären Kommunikation betrachtet (122).

Er setzt sich, wie der Name schon beschreibt, aus drei Funktionseinheiten zusammen: Rezeptoren, Januskinasen und STAT-Molekülen. Diese werden wiederum in Familien unterteilt, die eine verschiedene Anzahl an Mitgliedern aufweist. Die Januskinase-Familie besteht aus JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2, während STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 die STAT-Familie bilden. Klassisch erfolgt die Aktivierung des Signalweges durch Bindung eines Liganden an den passenden Rezeptor, wodurch eine JAK transphosphoryliert wird. Diese phosphoryliert wiederum den Rezeptor, sodass ein, zunächst frei im Zytoplasma vorliegendes, STAT-Molekül binden kann. Durch Phosphorylierung von STAT durch die JAK, kann dieses, nach Ablösen vom Rezeptor, Dimere bilden und in den Zellkern translozieren, wo es die Transkription von Zielgenen beeinflusst. Weiterhin gibt es Varianten in der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges, die nicht diesem klassischen Weg folgen: So kann beispielsweise STAT3 im ER die Apoptose beeinflussen, STAT1 direkt durch den Epidermal growth factor receptor (EGFR) aktiviert werden. Zudem sind Interaktionen mit anderen Signalwegen, wie dem MAPK-Signalweg, möglich (122).

Neben den oben bereits beschriebenen MPNs, spielt der JAK/STAT-Signalweg auch in vielen weiteren Erkrankungen eine zentrale Rolle. In Hodgkin-Lymphomen werden in ca. 80% der Patienten gain-of-function-Mutationen in STAT6 festgestellt (123). Außerdem ist eine JAK/STAT-Dysregulation an der Entstehung und dem Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes, atopischer Dermatitis und rheumatoider Arthritis beteiligt (122).

In den neutrophilen Granulozyten wird der JAK/STAT-Signalweg vor allem in der Übertragung von Zytokinrezeptor-Signalen eingesetzt. GM-CSF und G-CSF

beeinflussen über JAK2 und STAT3 oder STAT5 Differenzierung, Überleben und Aktivierung der PMNs (9). Neben der Aktivierung, wird ebenso die Abstimmung von Entzündungsreaktionen von verschiedenen Interleukinen wie IL-4, IL-6 und IL-15 gesteuert (9). Interferone können die Apoptose von PMNs verzögern und den oxidativen burst steigern, während IL-10 die Chemo- und Zytokinproduktion der neutrophilen Granulozyten beeinflusst (9). Die verschiedenen Rezeptoren interagieren mit verschiedenen, auch mehreren, Mitgliedern der JAK- und STAT-Familien, um spezifische Effekte auszuüben (122). Eine Beeinflussung des JAK/STAT-Signalweges durch Medikamente oder Mutationen kann also weitreichende und auch nicht leicht zu überschauende Konsequenzen, zunächst für die jeweiligen Zellreihen, final aber auch auf den gesamten Organismus haben.

### 2.3.1.3 Effektorfunktionen

Die Effektivität der neutrophilen Granulozyten in der Pathogenabwehr beruhen auf zwei Mechanismen: der Phagozytose und der „Neutrophil-Extrazellulär Trap (NET)“-ose. Beide werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Durch die oben beschriebene Bindung der Rezeptoren mit dem Fremdantigen wird die Phagozytose eingeleitet. Diese geschieht durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Membran und Veränderungen des Zytoskeletts. Schließlich umfließt die Membran den zu phagozytierenden Partikel, was als Endozytose bezeichnet wird, und schließt ihn in das sogenannte Phagosom ein (118).

Gleichzeitig wird die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) aktiviert. Hierzu bedarf es im ersten Schritt einem Enzym, der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Proton/Wasserstoffion (NADPH/H<sup>+</sup>)-Oxidase. Deren Aufgabe ist es, Elektronen, lokalisiert im Zytosol, von NADPH/H<sup>+</sup> auf molekularen Sauerstoff zu übertragen, sodass Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) entstehen (124). Die NADPH/H<sup>+</sup>-Oxidase befindet sich nicht nur in der Membran des Phagosoms, sondern auch in sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula. Diese fusionieren zusätzlich mit dem Phagosom, sodass mehr Superoxidanionen produziert werden können. Anschließend werden diese durch ein weiteres Enzym, die Superoxiddismutase, in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) umgewandelt. Auch kann die sogenannte Haber-Weiß-Reaktion stattfinden: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>-</sup> reagieren zu einem Hydroxylradikal (125). Katalysiert durch die Myeloperoxidase, ein Enzym aus den azurophilen Granula, wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hypochlorige Säure (HOCl), umgewandelt. Außerdem generiert die Stickstoffmonoxid (NO)-

Synthetase NO, welches mit Superoxidanionen bakterizide Zwischenprodukte bildet (125, 126).

Diese ROS wirken in ihrer Gesamtheit bakterizid, wobei HOCl von den genannten am schnellsten, potentesten und damit wahrscheinlich auch wichtigsten ist (126). Die enzymatischen Vorgänge werden zusammenfassend *oxidative burst* oder auch *respiratory burst* genannt (127).

Reeves et al. (128) stellten 2002 eine andere Hypothese auf, in der nicht die Bildung von ROS mithilfe der NADPH/H<sup>+</sup>-Oxidase entscheidend zur Tötung des Pathogens ist, sondern Proteasen aus den Granula, welche durch einen Kaliumionen-Fluss über die Membran angetrieben werde. Dies ist allerdings nicht als gängige Meinung vertreten und wird in mehreren Studien diskutiert (118, 129).

Auch ein weiterer Mechanismus spielt in der Beseitigung des Fremdartigen eine Rolle: Die *Degranulation*. Wie auch schon der Name der neutrophilen Granulozyten zeigt, besitzen diese verschiedene Arten von Granula. Die *azurophilen* - auch primäre und, wegen ihrer histochemischen Anfärbbarkeit, peroxidase-positive Granula genannt, enthalten neben der bereits erwähnten Myeloperoxidase auch Serinproteasen wie Cathepsin G, Neutrophile Elastase und Defensine. Auch die *spezifischen*, sekundären, Granula enthalten nicht nur oben genannte NADPH/H<sup>+</sup>-Oxidase, sondern auch andere antimikrobielle Stoffe wie Lysozym, Lactoferrin und Calprotectin. *Tertiäre* Granula, beinhalten nur wenige antimikrobielle Enzyme, dienen aber als Lagerraum für Metalloproteasen wie Gelatinase und Leukolysin. Mithilfe dieser Granula kann die Zerlegung des Pathogens im sogenannten Phagolysosom sauerstoffunabhängig geschehen (119, 125).

Die *NETose* wurde erstmals von Brinkmann et al. (130) beschrieben. Dabei stoßen die PMN eine Netzstruktur aus, die aus Enzymen aller Granula und DNA/Histonen besteht. In diesem Netz verfangen sich sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien und deren Virulenz wird eingeschränkt. Ob es auch zum direkten extrazellulären Töten der Pathogene kommt, ist noch nicht ganz geklärt; die Fähigkeiten dazu sind aber verankert (131). Zusätzlich wird NETose auch zur Verteidigung gegen Pilze und Viren eingesetzt (132). Weitere Aspekte der NETose sind aber aktuell noch nicht gänzlich geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung (132).

Zusätzlich zur Verteidigung des Körpers gegen Pathogene scheinen die neutrophilen Granulozyten einen Einfluss auf die Regulation verschiedener Zellen des Immunsystems wie DC, NK und Lymphozyten zu haben (129). Unter anderem deswegen werden sie auch im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten erforscht (132).

### **2.3.1.4 Die Rolle in MPN**

Durch ihre Zugehörigkeit zum angeborenen Immunsystem agieren die PMN im Rahmen von Entzündung. Wie oben bereits aufgeführt ist Inflammation ein essentieller Bestandteil der Pathogenese der MPN. So erscheint es nicht verwunderlich, dass auch Korrelationen zwischen PMN und MPN gefunden wurden. Boiocchi et al. beschreiben die neutrophile Leukozytose als negativen prädiktiven Marker für das Gesamtüberleben und als Anzeige für den Übergang zur Post-PV MF in PV Patient\*innen (133).

Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Thrombosen, einer relevanten Komplikation der MPN, und einer ständigen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (44). Dabei kann aber nicht ein einzelner Faktor als entscheidend gewertet werden, vielmehr entsteht dies durch die Kombination verschiedener Umstände, die im Folgenden erläutert werden.

Burgaleta et al. zeigten eine erhöhte Expression von CD11b/CD18 auf PMN von Patient\*innen mit PV und ET (134). Dieser Rezeptor ist relevant für Phagozytose, aber auch Adhäsion, beispielsweise an Endothelien (44). Weiterhin gibt es Daten, die eine Aktivierung des  $\beta$ 1-Integrins durch die JAK2V617F-Mutation darlegen, was zu vermehrten Thrombosen und einer Sequestration der PMN in der Milz führt (135, 136). Zusätzlich konnten vermehrt Aggregationen zwischen Leukozyten bzw. neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in peripheren Blutproben von MPN-Patient\*innen gefunden werden (137, 138). All diese Funktionsveränderungen werden als mögliche Treiber der Entstehung von Thrombosen gesehen (139).

Auch die NETose scheint, zumindest im Mausmodell, mit der Bildung von Thrombosen assoziiert zu sein (140). Generell bleibt die Datenlage dazu allerdings uneindeutig (141). Vermutet wird, dass die Behandlung einzelner Studienpatient\*innen mit JAK-Inhibitoren zu einer Einschränkung der NETose und somit zur Abweichung der Studienergebnisse untereinander führt (140, 141).

Weiterhin wurde im Knochenmark von MPN-Patient\*innen vermehrt ein histologisches Phänomen beschrieben: 75% der PV und 100% der ET-Patient\*innen zeigten Emperipoese. Diese stellt eine Aufnahme eines Zelltyps (hier neutrophiler und eosinophiler Granulozyten) durch einen anderen (hier Megakaryozyten) dar (44, 142). Auch 75% der Patient\*innen mit reaktiver Thrombozytose zeigten dies, sodass eine Korrelation zwischen Emperipoese und Thrombozytose angenommen wird (44, 142). Des Weiteren führt die Emperipoese der PMN durch die Megakaryozyten zur Aktivierung von Fibroblasten im Knochenmark und damit zur Fibrose (143).

Neben den oben genannten Erkenntnissen zeigte sich zusätzlich die Funktion des oxidativen burst der neutrophilen Granulozyten bei MPN-Patient\*innen eingeschränkt (134).

Aus diesen Erkenntnissen kann man schließen, dass auch die neutrophilen Granulozyten an der Pathogenese der MPN und vor allem an der Entstehung von Thrombosen als Komplikation beteiligt sind. Inwieweit aber die Rolle strikt getrennt werden kann von dem Umstand, dass PMN als Teil des Immunsystems an der Entstehung und Ausführung von Inflammation beteiligt sind, bleibt weiterhin unklar. So konnten Slezak et al. nachweisen, dass die Neutrophilie in MPN auch durch eine Aktivierung entzündlicher Signalwege neutrophiler Granulozyten entsteht (144).



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Patient\*innenkollektiv

Zwischen 20. November 2018 und 20. Dezember 2019 wurden die Daten von 13 Patient\*innen mit MPN, die eine Behandlung mit Ruxolitinib erhielten, gesammelt. Sie alle befanden sich zu diesem Zeitraum in ambulanter oder stationärer Behandlung der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz, oder zweier niedergelassenen Hämatologen und Onkologen, beides zuführende Praxen der Universitätsmedizin. Nach Aufklärung der Patient\*innen über die Zielsetzung dieser Arbeit, der Risiken einer Blutentnahme und der Erhebung und Umgang mit personenbezogenen Daten, erfolgte eine schriftliche Einwilligung zur Teilnahme. Danach wurde Blut aus den oberflächlichen Venen der Armbeuge der Patient\*innen mithilfe einer Ammonium (NH<sub>4</sub>)–Heparin-Monovette gewonnen.

Die Basischarakteristika sowie die Diagnosen (nach WHO 2016) der Patient\*innen werden in Tabelle 19 und Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 19: Allgemeine Parameter der Patient\*innen

Anzahl	13
Medianes Alter (Spannweite)	66 (41-76) Jahre
Geschlechtsverteilung	8 (62%) männliche Patienten 5 (38%) weibliche Patientinnen

Tabelle 20: Diagnosen (nach WHO 2016) der Patient\*innen

Diagnosen		Anzahl
PV		1 (8%)
ET		1 (8%)
MF	Gesamt	11 (85%)
	Primär	8 (62%)

## Material und Methoden

sekundär	2 (15%)
unklar	1 (8%)

### 3.1.1.1 Einschlusskriterien

In dieser Arbeit wurden Patient\*innen der hämatologisch-onkologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Mainz sowie zweier niedergelassener Kolleg\*innen erfasst, die an MPN litten und mit dem TKI Ruxolitinib behandelt wurden.

### 3.1.1.2 Ausschlusskriterien

Nicht eingeschlossen wurden Personen mit Infektionen, die einer stationären Behandlung bedurften.

### 3.1.2 Kontrollgruppen

Als Kontrollen standen zwei Gruppen zur Verfügung: Zum einen wurden die Untersuchungen an zwölf gesunden Kontrollproband\*innen bzw. CML-Patient\*innen in Remission (hier gesunde Probanden), andererseits aber auch an elf Patient\*innen durchgeführt, die zwar an MPN erkrankt sind, bei denen allerdings keine Therapie mit Ruxolitinib erfolgt (hier: MPN ohne Ruxolitinib). Alle Kontrollen wurden zwischen dem 22. August 2019 und dem 19. Juni 2020 in der hämatologischen Ambulanz der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz oder dem persönlichen Umfeld der Autorin dieser Arbeit gefunden. Bei allen lag zum Entnahmezeitpunkt des Blutes eine Einwilligung zur Verwendung des Blutes und ihrer anonymisierten Daten zu Forschungszwecken vor. Die Basischarakteristika dieser Gruppen liegen in Tabelle 21 und Tabelle 22 vor.

Tabelle 21: Allgemeine Parameter der gesunden Proband\*innen

Anzahl	12
Medianes Alter (Spannweite)	64 (45 bis 85) Jahre
Geschlechtsverteilung	8 (66%) männliche gesunde Probanden 4 (33%) weibliche gesunde Probandinnen

Anzahl	11
Medianes Alter (Spannweite)	55 (26 bis 79) Jahre
Geschlechtsverteilung	4 (36%) männliche Patienten 7 (64%) weibliche Patientinnen

### 3.1.3 Versuchsräumlichkeiten

Die experimentelle Arbeit erfolgte am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz. Im Labor der Arbeitsgemeinschaft Radsak wurden die Färbungen der Proben von Patient\*innen und Kontrollgruppen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Die Funktionsmessungen via Durchflusszytometrie fanden mithilfe des Navios Zytometers von Beckman Coulter im FACS-Labor der III. Medizinischen Klinik statt.

### 3.1.4 Verwendete Materialien

#### 3.1.4.1 Puffer

*Phosphate buffered saline (PBS):*

- 1,4 Mol (M) Natriumchlorid (NaCl)
- 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) pH 7,2

FACS-Puffer:

- 1 Prozent bovines Serumalbumin (BSA)
- 0,02 Prozent Natrium-Acetat
- 1 mM EDTA  
in PBS

#### 3.1.4.2 Reagenzien

VersaLyse Lysing Solution	Beckman Coulter
IO Test 3 Fixative Solution	Beckman Coulter
S. typhimurium LPS [1µg/ml]	Sigma-Aldrich
Dichlorfluorescein (DCF)	Sigma Aldrich

## Material und Methoden

Fluoresbrite® Polychromatic Red	Polyscience
Microspheres [1,0µm]	
S. cerevisiae Zymosan	Sigma Aldrich
GM-CSF human	Sigma Aldrich

### 3.1.4.3 Antikörper

Tabelle 23: FACS-Antikörper der Funktionsmessung

Antigen	Klon	Markierung	Herkunft
CD11b	ICRF44	Pacific Blue	BioLegend
CD62L	DREG-56	APC-Cy7	BioLegend
CD66abce	Tet2	APC	Miltenyi Biotec

### 3.1.4.4 Verbrauchsmaterialien

Ammonium-Heparin Monovette	Sarstedt
Einweg-Handschuhe	Rotiprotect
Entsorgungsbeutel	Roth
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt
kodan® Tinktur forte farblos	Schülke&Mayr GmbH
Pipettenspitzen	StarLab
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss	Greiner
Pur-Zellin Zellstofftupfer	Hartmann
Sarstedt Multiadapter	Sarstedt
Venofix® - Venenpunktionsbesteck	B. Braun

### 3.1.5 Geräte

Kanülenabwurfsammelbehälter	Dahlhausen, SharpSAFE
Gefäßständer	Neolab
Inkubator	Sanyo Electric
Kühlschrank	Liebherr
Pipetten	Gilson
Venenstauschlauch	Med Comfort
Vortex	Bender & Hobein AG
Zentrifuge	ThermoFisher

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Funktionsmessung der PMNs – Vollblut FACS-Protokoll**

Die Patient\*innen- und Kontrollproben aus der Ammonium-Heparin-Monovette wurden noch am Tag der Vollblutentnahme im Labor auf die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet.

Es wurden je 100µl Vollblut auf acht 5ml FACS-Röhrchen vorbereitet. LPS, Zymosan und GM-CSF wurden zunächst in PBS vorverdünnt, sodass Ansätze in folgenden Verhältnissen entstanden.

Ansatz 1: LPS 1:100

Ansatz 2: Zymosan 1:666

Ansatz 3: GM-CSF 1:5000

Ansatz 4: keine weiteren Reagenzien

Jeder Ansatz wurde zwei FACS-Röhrchen hinzugefügt.

Je einem der jeweiligen Ansätze wurden dann PE-Beads, 1:200 verdünnt, oder DCF, 1:14000 verdünnt, hinzugefügt, sodass je ein Ansatz mit dem jeweiligen Stimulanz und PE-Beads oder DCF existiert.

Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min.

Zum Abschluss der Färbung wurden den Ansätzen, die mit DCF versetzt wurden, eine zuvor verdünnte AK-Lösung, 1:10 verdünnt, hinzugegeben. Diese enthält die AK CD11b, CD62L sowie CD66abce 1:30 in FACS-Puffer verdünnt.

Erneut erfolgte eine Inkubation, diese für 15 min auf Eis, um eine Bindung der Proteine an Zelloberflächenmoleküle zu gewährleisten.

Dem schloss sich die Lyse mittels VersaLyse Lysing Solution an. Die Ansätze wurden mit je 2ml der Lösung für 30min versetzt. Danach wurden diese zweimal mit 2ml PBS gewaschen. Nach jedem Waschen erfolgte eine Trennung von flüssigen und festen Bestandteilen mittels Zentrifuge bei 1800 Umdrehungen pro Minute für zwei Minuten bei 23°C, danach wurde der Überstand verworfen. Erneut erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mit je 500µl VersaLyse Lysing Solution, mit angeschlossenen Waschen mit jeweils 1ml PBS.

## Material und Methoden

---

Nach erneutem Trennen der Bestandteile durch Zentrifugieren und abschütten des Überstandes, wurden die festen Bestandteile in 100µl PBS aufgenommen und für 15 min im Dunkeln inkubiert.

Abschließend wurden die Proben erneut gewaschen, dieses Mal mit je 3ml PBS, zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und sie wurden mit jeweils 500µl IO Test Fixative Solution, 1:80 verdünnt in PBS, fixiert.

Dies beendet die Vorbereitungen der neutrophilen Granulozyten auf die durchflusszytometrische Funktionsmessung.

Am 06. Juni 2020 wurde eine Zwischenanalyse der Ergebnisse durchgeführt und festgestellt, dass die Färbung mit CD62L und damit der Nachweis des L-Selektin-Sheddings nicht erfolgreich war. Im Anschluss daran, also bei Probe 9 bis 11 der gesunden Kontrollpatient\*innen und Probe 8 bis 11 der Patient\*innen mit MPN, die keine Therapie mit Ruxolitinib erhielten, wurde somit auf eine weitere Färbung mit CD62L verzichtet.

### **3.2.2 Durchflusszytometrische Analyse**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Unterscheidung leukozytärer Zellen. In einfachen Durchflusszytometern fließen die Blutzellen vereinzelt in eine Kammer, die „Flow Cell“, und werden dort mit Lasern verschiedener Wellenlängen bestrahlt. Die Zellen unterscheiden sich dann anhand ihres Streulichtes, dem „Light scatter“, bei dem zwischen dem Vorwärts gerichteten „forward scatter“ (FSC), die Größe der Zellen darstellend, und dem seitwärts gerichteten „side scatter“ (SSC), anhand dessen die Granulierung der Zellen gemessen werden kann, unterschieden wird (145).

Im Falle dieser Arbeit wurde mit einem spezielleren Gerät, dem Fluorescence activated cell sorting, kurz FACS, gearbeitet. Bei diesem werden die Zellen vor der Messung mit Antikörpern vorinkubiert, die durch das Abtasten der Zelloberfläche mit Lasern zur Fluoreszenz angeregt werden. Dadurch emittieren sie Licht in verschiedenen Wellenlängen, anhand dessen die Zellen wiederum unterschieden werden können (145).

## Material und Methoden

Die Funktionsmessungen via FACS fanden mithilfe des Navios Zytometers von Beckman Coulter statt. Zur Analyse der gewonnenen Daten wurde die FlowJo® Software Version 10.5.3© verwendet.

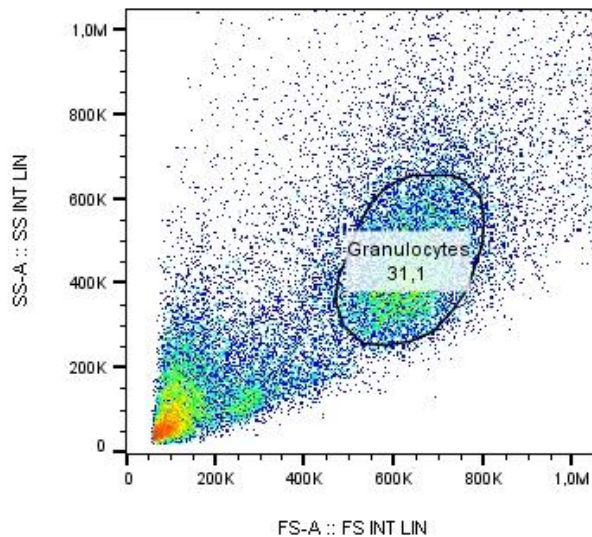


Abbildung 3: Gating-Technik zur Auswertung der PMN-Funktionen

Zur funktionellen Datenanalyse werden zunächst auf der X-Achse der forward scatter und auf der Y-Achse der Side scatter ausgewählt. Alle Zellen, die durch das Streulicht erkannt wurden, sind in diesem Fenster (Gate) als Punkte im Streudiagramm dargestellt. Nun werden die für die Untersuchung relevanten Zellen, in diesem Fall die neutrophilen Granulozyten, im Diagramm markiert (siehe dazu Abbildung 3).

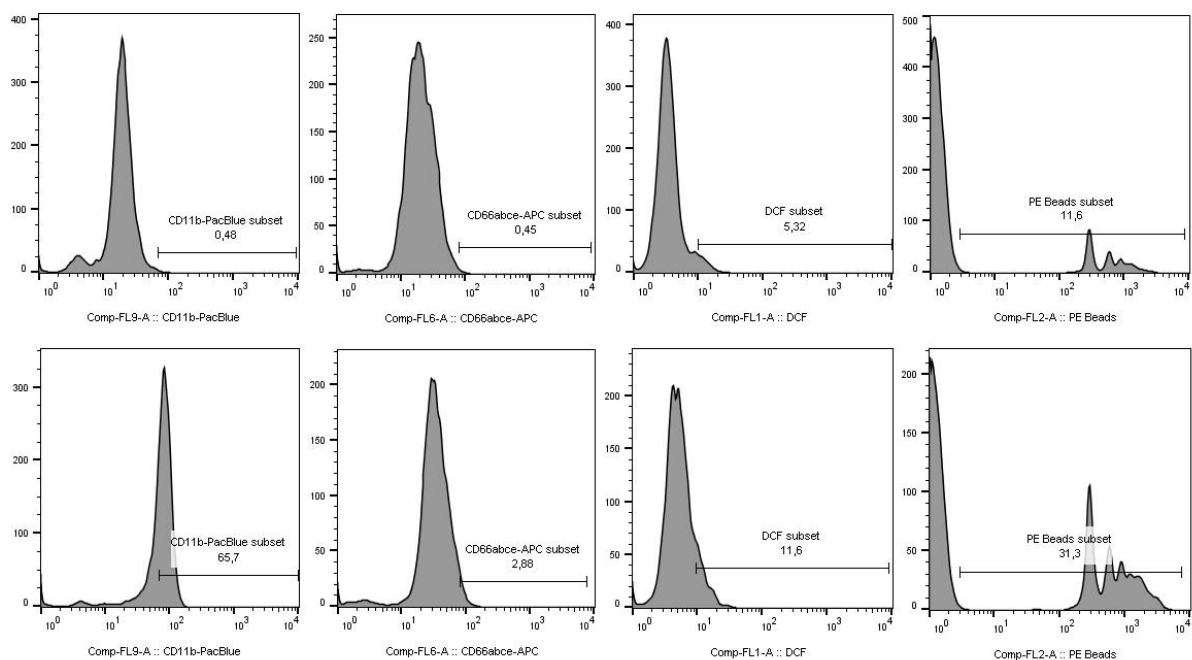


Abbildung 4: Beispielanalyse der Degranulation von CD11b, CD66b, des oxidativen burst, sowie der phagozytotischen Aktivität eines MPN-Patienten unter Therapie mit Ruxolitinib; obere Reihe: ohne Stimulans, untere Reihe: unter Stimulation mit LPS

## Material und Methoden

---

Anschließend kann man dieses ausgewählte Zellkollektiv in den unstimulierten und durch LPS, Zymosan und GM-CSF stimulierten Effektorfunktionen vergleichen: Dazu wird die Achseneinstellung der X-Achse auf die jeweilige Konstante (CD11b, CD66abce, DCF oder PE-Beads) geändert. Die sich daraus ergebenden Histogramme sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Effektorfunktionen der PMN werden als Aktivitätsindices analysiert: Dabei stehen die *mean fluorescence intensities* (MFI) der stimulierten Ansätze im Zähler des Quotienten, im Nenner die MFI der unstimulierten Ansätze.

### **3.2.3 Statistische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben mit FlowJo. Die dadurch erlangten Daten wurden zunächst in Microsoft Excel 2010 Version 14.0.7258.5000 tabellarisch gesammelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism Version 9.0.0 (Graphpad, San Diego, CA, USA). Zur vergleichenden Auswertung von Patient\*innen- und Kontrolldaten wurden je nach vorliegendem Datensatz one-way und two-way ANOVA eingesetzt, ein p-Wert von  $\delta 0,05$  wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte in einem gruppierten Säulendiagramm.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Demographische Daten

Zwischen dem 20. November 2018 und dem 19. Juni 2020 wurden die Patient\*innen und Proband\*innen der Kontrollgruppen dieser Studie zugeführt. Zur Gewinnung der patienten- und krankheitsassoziierten Daten wurden Arztbriefe über stationäre Krankenhausaufenthalte, Ambulanzberichte der Poliklinik und das klinische Dokumentationssystem SAP der Universitätsmedizin Mainz, sowie die Dokumentationssysteme der zuweisenden Ärzte genutzt.

#### 4.1.1 Patient\*innen

Die Patient\*innenproben wurden wie in 3.1.1 beschrieben zwischen dem 20. November 2018 und dem 20. Dezember 2019 gewonnen. Folgende Daten zu den Patient\*innen, sofern verfügbar, wurden aus den Datenbanken erhoben:

- Name, Geschlecht, Geburtsdatum
- WHO-Diagnose und Datum der Erstdiagnose
- Haupt- und Nebenmutationen
- Prognosescore
- Therapieverlauf und aktuelle Therapie, sowie Einnahmezeitraum der Medikation
- Laborwerte zu Mess- und Diagnosezeitpunkt :Hämoglobin (Hb), Leukozyten (WBC),Thrombozyten (PLTS), absolute Zahl der Neutrophilen (ANC)
- Laborwerte zum Messzeitpunkt: CRP

Insgesamt wurden 13 Patient\*innen unter Therapie mit Ruxolitinib in die Untersuchung aufgenommen. 62% (n=8) der Patient\*innen sind männlich, 38% (n=5) weiblich. Das durchschnittliche Alter liegt bei 65,62 Jahren, der Median liegt bei 66 Jahren mit einer Spannweite vom Minimum von 41 bis zu einem Maximum von 76 Jahren. Je 8% (n=1) leiden an PV und ET, mit 85% (n=11) ist der größte Teil der Patient\*innen an MF erkrankt. Diese können wieder untergliedert werden in 62% (n=8) mit primärer MF und 15% (n=2) mit sekundärer MF, die zuvor jeweils an PV oder ET litten. Bei einem Patienten (8%) konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden, ob eine primäre oder sekundäre MF vorlag.

## Ergebnisse

In Abbildung 5 wird dargestellt wie sich die Hauptmutationen in den untersuchten Patient\*innen, die Ruxolitinib einnehmen, verteilt: 62% (n=8) wurden positiv auf JAK2V617F getestet, 23% (n=3) positiv auf CALR und bei 15% (n=2) wurde keine der drei Hauptmutationen gefunden.

Die Nebenmutationen wurden lediglich bei drei Patient\*innen getestet; zwei von ihnen sind ASXL1- und SRSF2-positiv, einer wies Mutationen in EZH2, ZRSR2 und CBL auf.

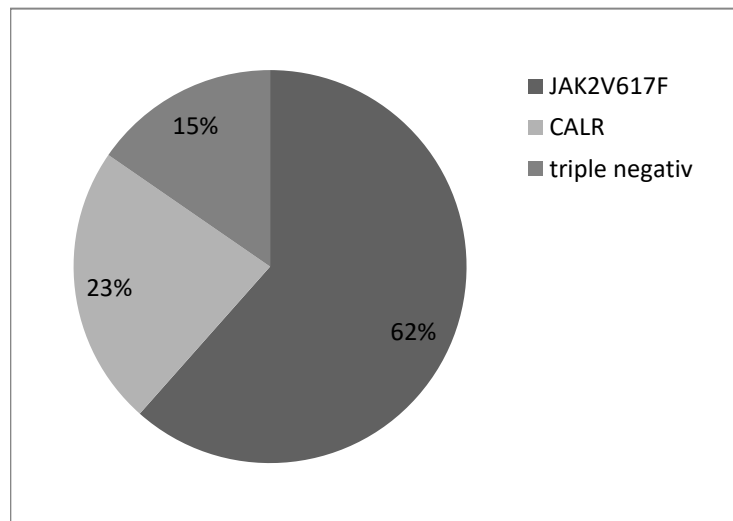


Abbildung 3: Verteilung der Mutationen in Patient\*innen mit Ruxolitinib

### 4.1.2 Kontrollgruppen

Wie bereits in 3.1.2 beschrieben, wurden zwischen dem 22. August 2019 und dem 18. Juni 2020 Patient\*innen der hämatologischen Ambulanz der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz den zwei Kontrollgruppen „gesunde Probanden“ und „MPN ohne Ruxolitinib“ zugeführt. Es wurden folgende Daten erhoben:

- Name, Geschlecht, Geburtsdatum
- WHO-Diagnose und Datum der Erstdiagnose
- Aktuelle Therapie

Zusätzlich wurde bei der Kontrollgruppe „MPN ohne Ruxolitinib“ folgende weitere Daten erhoben:

- Haupt- und Nebenmutationen, Zytogenetik
- Prognosescore
- Therapieverlauf, Einnahmezeitraum der Medikation

Insgesamt wurden zwölf gesunde Proband\*innen in die Analyse einbezogen. Sie teilen sich auf in 66% (n=8) männliche und 33% (n=4) weibliche Proband\*innen. Das durchschnittliche Alter beträgt 63,58 Jahre, der Median liegt bei 64 Jahren mit einem Maximum von 85 und einem Minimum von 45 Jahren. Vier von ihnen waren gesund,

## Ergebnisse

litten also an keiner hämatologischen Grunderkrankung. Acht der Proband\*innen litten in der Vergangenheit an einer CML, befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in klinischer und molekularer Remission, sodass keine Medikation zur Behandlung der CML erfolgte.

Elf Proband\*innen, die an MPN litten, aber kein Ruxolitinib nehmen, wurden in die Studie einbezogen. Sieben (64%) der Probanden waren weiblich, vier (36%) männlich. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 52,46 Jahre, der Median 55 Jahre.

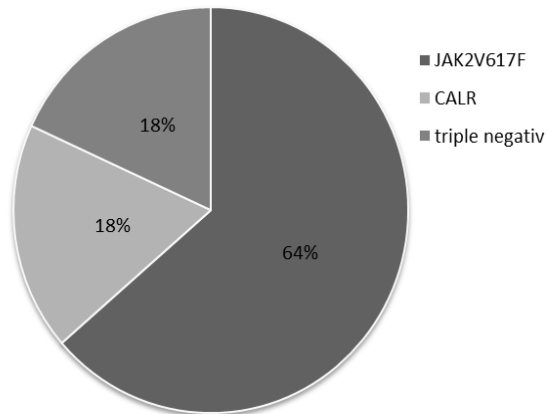


Abbildung 4: Verteilung der Mutationen in MPN ohne Ruxolitinib

Demzufolge handelt es sich um eine rechtsschiefe Verteilung. Das Maximum liegt bei 79, das Minimum bei 26 Jahren.

45,5 % (n=5) leiden an einer ET, ebenso viele an PV. Bei 9% (n=1) konnte zum Messzeitpunkt noch keine genaue Differenzierung zwischen PV und ET erfolgen, und wird deshalb unter „MPN, unklar“ geführt. Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurden 64% (n=7) der Patient\*innen JAK2V617F-positiv, 18% (n=2) CALR-positiv und ebenfalls 18% (n=2) negativ auf jede der drei Hauptmutationen der BCR-ABL1-negativen MPN getestet. Keiner der Patient\*innen wurde auf die oben genannten zusätzlichen Mutationen getestet. Die aktuellen Therapien der Patient\*innen können Tabelle 24 entnommen werden. Eine Patientin hat eine Therapie mit Ruxolitinib in der Vergangenheit abgebrochen.

Tabelle 24: Therapien der Proband\*innen mit MPN ohne Ruxolitinib

Erkrankung	Therapie	Zahlen	
		Relativ	absolut
ET	Hydroxyurea	28%	3
	Hydroxycarbamid	10%	1

## Ergebnisse

---

	Acetylsalicylsäure	10%	1
<b>PV</b>	Hydroxyurea	19%	2
	Pegyliertes Interferon	19%	2
	Acetylsalicylsäure	10%	1
<b>MPN, unklar</b>	Acetylsalicylsäure	10%	1
	Aderlass	10%	1

---

## 4.2 Oberflächenexpressionsmuster der PMNs

Vor Untersuchung der Degranulation der PMNs nach Stimulation, wurde eine Analyse der basalen Expression, d.h. ohne Einwirkung von Zymosan, LPS oder GM-CSF, der Oberflächenproteine CD11b und CD66b durchgeführt.

Die MFIs der Patient\*innen wurden mit den entsprechenden MFIs der beiden Kontrollgruppen in Säulendiagrammen mit Mittelwerten und der jeweiligen Standardabweichung (SE) nach oben dargestellt. Eine Signifikanzprüfung mittels one-way ANOVA ergab für keinen Unterschied p-Werte kleiner oder gleich dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05.

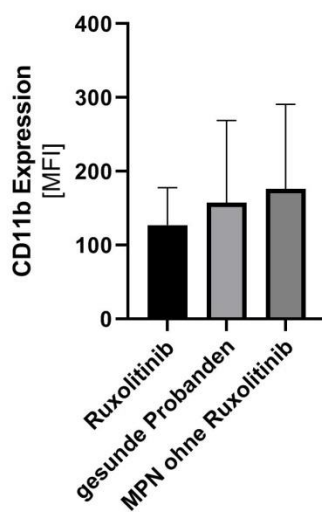


Abbildung 5: Gegenüberstellung der CD11b Expression auf PMNs der Patient\*innen unter Ruxolitinib und beiden Kontrollgruppen

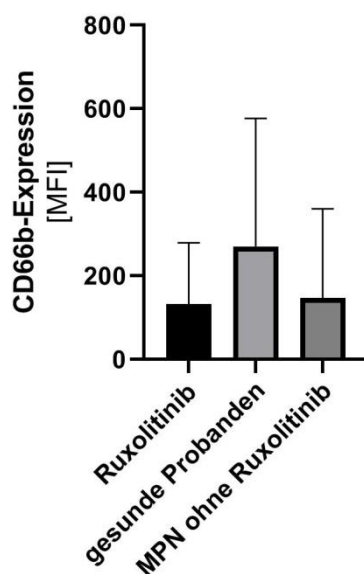


Abbildung 6: Gegenüberstellung der CD66b Expression auf PMNs der Patient\*innen unter Ruxolitinib und beiden Kontrollgruppen

In Abbildung 7 ist die basale Expression des Oberflächenmarkers CD11b bei PMNs der Patientengruppe sowie die der beiden Kontrollgruppen dargestellt. CD11b scheint bei Patient\*innen mit MPN im Vergleich zu gesunden Proband\*innen erhöht exprimiert. Unter Therapie mit Ruxolitinib jedoch fällt eine Reduktion verglichen mit beiden Kontrollgruppen auf.

Die Expression von CD66b zeigt sich bei allen PMNs von Patient\*innen, die an MPN erkrankt sind, verringert im Vergleich zu gesunden Proband\*innen (vergleiche dazu Abbildung 8). Ein Unterschied in der Therapie der MPN bzw. der Einsatz von Ruxolitinib scheint keinen Einfluss auf den Oberflächenmarker CD66b ohne Einwirken eines Stimulans zu haben.

### 4.3 Funktionsmessungen der neutrophilen Granulozyten

Die Aktivitätsindices (Quotienten aus der MFI der stimulierten Probe und MFI der unstimulierten Probe, siehe dazu auch Absatz 3.2.2) der vierzehn Patient\*innen wurden mit den entsprechenden Aktivitätsindices der beiden Kontrollgruppen in einer Grafik vergleichend dargestellt. In den folgenden gruppierten Säulendiagrammen sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung nach oben aufgetragen.

Eine Signifikanzprüfung durch den two-way ANOVA ergab für keine Effektorfunktion p-Werte kleiner oder gleich 0,05. Zudem erfolgte eine Signifikanzprüfung der verschiedenen Stimulationen. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Eine Analyse der methodischen Fehler erfolgt in der Diskussion.

#### 4.3.1 Oxidativer Burst

Der oxidative burst der neutrophilen Granulozyten wurde mithilfe des mittleren Fluoreszenzniveaus von DCF nach Stimulation mit oben genannten Stimulantien quantifiziert.

In Abbildung 9 wurden die Aktivitätsindices des oxidativen burst nach Stimulation mit Zymosan, LPS und GM-CSF dargestellt. Dabei werden die Patient\*innen- und Kontrollgruppen jeweils gruppiert nach dem entsprechenden Stimulans.

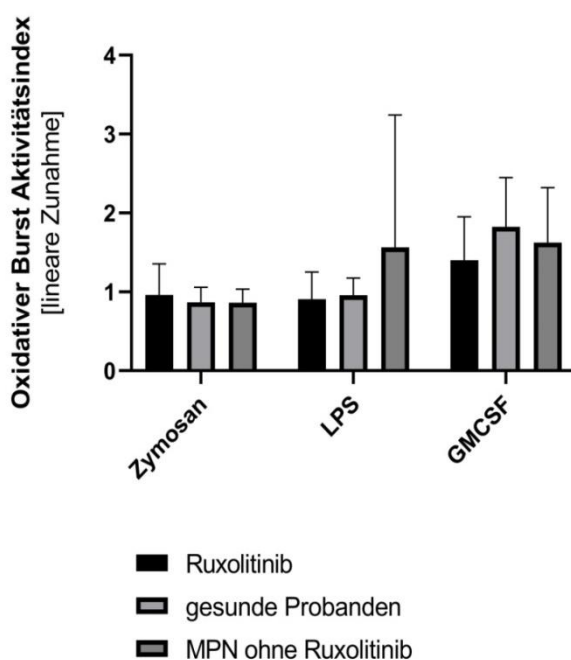


Abbildung 7: Vergleich des oxidativen burst zwischen der Patient\*innengruppe und beiden Kontrollgruppen

Die Entladung der ROS scheint in der Patient\*innengruppe unter Stimulation mit LPS und GM-CSF im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen vermindert, unter dem Stimulans Zymosan hingegen leicht erhöht. Beide Kontrollgruppen weisen deutliche Unterschiede auf; so tritt in der Gruppe der gesunden Probanden der höchste Mittelwert unter Stimulation mit GM-CSF auf, die Gruppe der an MPN Erkrankten, die aber keine Therapie mit

## Ergebnisse

Ruxolitinib erhalten, zeigt den höchsten Mittelwert unter Stimulation mit LPS. Zumindest letzteres kann durch einige stark abweichende Messergebnisse, gemessen anhand der SE, ausgelöst sein.

Zusammenfassend stellt sich der oxidative burst in der Patient\*innengruppe verringert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen unter dem Stimulans GM-CSF dar.

### 4.3.2 Degranulation

Die Funktion der Degranulation kann mit Hilfe der Expression der Proteine CD66b und CD11b gemessen werden. Abbildung 10 stellt die Degranulationsindices von CD11b, Abbildung 11 die von CD66b dar.

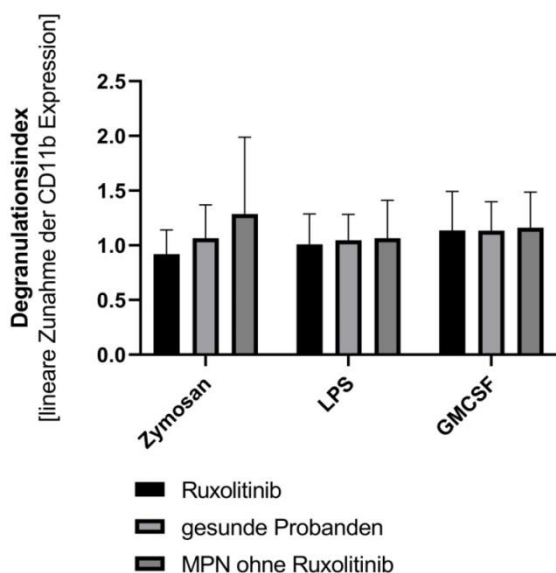


Abbildung 8: Vergleich der Expression von CD11b zwischen der Patient\*innengruppe und beiden Kontrollgruppen

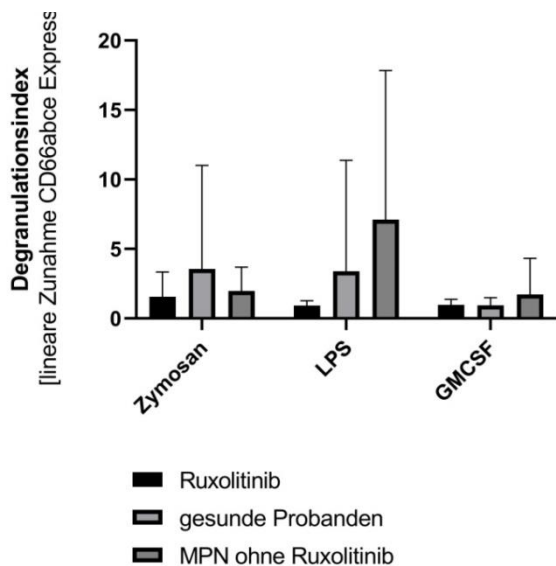


Abbildung 9: Vergleich der Expression von CD66b zwischen der Patient\*innengruppe und beiden Kontrollgruppen

In beiden Graphiken stellt sich die Expression von CD66b und CD11b der Patient\*innen unter Ruxolitinib verringert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen dar. Diese Unterschiede sind vor allem in Abbildung 11 zu erkennen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass auch die Streuung der Indices in den beiden Kontrollgruppen, insbesondere unter Stimulaton mit LPS, vergrößert ist, und somit zu einem höheren Mittelwert führt. In Abbildung 10 stellen sich die Unterschiede geringer dar; zwischen den beiden Kontrollgruppen ist unter Stimulation mit LPS und GM-CSF kaum ein Unterschied zu erkennen. Unter Stimulation mit Zymosan ist der Unterschied deutlicher ersichtlich. Trotzdem ist er, betrachtet man den absoluten Wert, gering.



### 4.3.3 Phagozytotische Aktivität

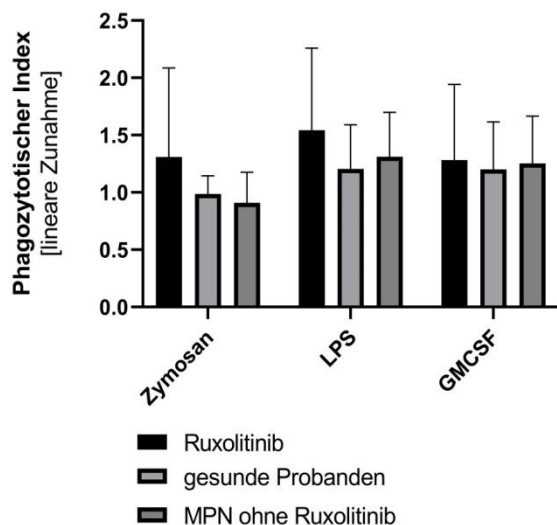


Abbildung 10: Vergleich der phagozytotischen Aktivität der Patient\*innengruppe mit beiden Kontrollgruppen

Der phagozytotische Index zeigt sich unter Anwendung aller drei Stimulantien in der Gruppe der Patient\*innen, die Ruxolitinib als Therapie bekommen, im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen erhöht. Auch hier ist allerdings der höhere Grad an Streuung der Indices im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen zu beachten. Unter Stimulation von LPS und GM-CSF zeigen sich diskrete Unterschiede zwischen beiden Kontrollgruppen; so liegt der Mittelwert der Indices der

Kontrollgruppe „MPN ohne Ruxolitinib“ beide Male höher als bei den gesunden Probanden. Unter Stimulation mit Zymosan stellt sich dieser Unterschied umgekehrt dar.

## **5 Diskussion**

Patient\*innen, die zur Behandlung der MPN Ruxolitinib einnehmen, weisen immer wieder Nebenwirkungen auf, die sich vor allem im Spektrum der Infektion befinden. So konnten in Studien leichte Infektionen durch Bakterien, aber auch schwerwiegendere Verläufe durch parasitäre oder virale Erreger beschrieben werden. Genauere Veröffentlichungen sind in Kapitel 2.2.3 aufgeführt (6, 100-110). Dies wird auf die Inhibition des komplexen JAK/STAT-Signalweges zurückgeführt. Deshalb verwundert es kaum, dass schon einige Untersuchungen der Wirkung von Ruxolitinib auf die verschiedensten Zellen des Immunsystems durchgeführt wurden (s.2.2.3). Diese Arbeit versucht dem einige Erkenntnisse über die Wirkung von Ruxolitinib auf neutrophile Granulozyten hinzuzufügen und im Zusammenhang mit bereits vorhandenen Daten zu diskutieren.

Ebenso erfolgt die Auseinandersetzung mit der Frage, welche Rolle die Inflammation in der Pathogenese der MPN spielt. Denn die immer noch gebräuchliche These, dass vor allem die Treibermutationen ursächlich sind, kann und wird mittlerweile immer mehr in Zweifel gezogen (29). Diese Arbeit möchte sich auch dieser Diskussion widmen, vor allem in Hinblick darauf, das Potential der JAK-Inhibitoren, in diesem Falle speziell von Ruxolitinib zu erkennen und Möglichkeiten aufzeigen, wie dieses unterschätzte Potential in Zukunft in der Therapie der MPN besser genutzt werden kann.

### **5.1 Patient\*innenkollektiv und Kontrollgruppe**

Um die Ergebnisse dieser Arbeit mit weiteren, möglicherweise auch erst kommenden, Studien vergleichen zu können, wurde unter 4.1.1 das Patient\*innenkollektiv, unter 4.1.2 die Kontrollgruppe und die erhobenen Daten beschrieben. Dieses birgt an sich schon einige Limitationen, die in der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

So scheint generell eine Zahl von 13 Proband\*innen zu gering, um die komplette Bandbreite der MPN, die mit Ruxolitinib behandelt werden, abzubilden. Dies resultiert zum einen aus der Dauer der Patient\*innenrekrutierung, allerdings auch daraus, dass Ruxolitinib in Deutschland nur als Therapeutikum der zweiten Wahl zugelassen ist. Somit verringert sich, durch die geringe Prävalenz der Erkrankung, der sehr kleine Pool an möglichen Patient\*innen noch um ein Vielfaches. Zudem besteht, wie

## Diskussion

---

oben beschrieben, eine große Anzahl an anderen Therapieoptionen sodass Ruxolitinib nicht als einziges Mittel zur Zweitlinientherapie eingesetzt werden kann. Außerdem sprechen vor allem PV und ET, aber auch frühe Stadien der MF noch häufig sehr gut auf eine Erstlinientherapie mit HU und die symptomatische Therapie an, eine Zweitlinientherapie findet also selten Anwendung.

Zusätzlich zur Anzahl der Proband\*innen ist außerdem die Gruppe sehr inhomogen. Bei manchen der Patient\*innen erfolgte die Erstdiagnose schon vor mehr als 10 Jahren, andere erhielten ihre Diagnose erst zwei Jahre vor Einschluss in diese Arbeit. Dabei muss man bedenken, dass in längeren Verläufen der Erkrankungen auch andere, der bereits unter 2.1.3.5 genannten Nebenmutationen auftreten können, die in einer Veränderung der Prognose aber auch Wandlung des Phänotyps resultieren können (23). Dies ist allerdings zum Zeitpunkt der Fertigung dieser Arbeit noch nicht ausreichend erforscht. Zudem wurden Patient\*innen mit längerem Krankheitsverlauf schon mit einer Vielzahl an Therapeutika behandelt, bevor sie auf eine Zweitlinienmedikation umgestellt wurden, während Patient\*innen mit kürzerer Krankheitsdauer nur wenige oder gar erst eine vorherige Therapie erhielten, und schnell auf Ruxolitinib umgestellt wurden. Auch der Einnahmezeitraum der Medikation liegt in den Patient\*innen sehr unterschiedlich vor: Ruxolitinib beeinflusst mit seiner Wirkung und damit auch seinen Nebenwirkungen manche Patient\*innen schon seit Jahren, andere erst seit Wochen.

Die Verteilung der Diagnosen stellt sich in der Patient\*innengruppe nicht gleichmäßig verteilt dar: So überwiegt der Anteil an Patienten mit MF deutlich den der PV- und ET-Patient\*innen. Dabei tritt auch ein weiteres Problem auf: Eine Diagnose der MF bleibt trotz ihrer Kriterien in ihrer Ätiologie nicht ganz eindeutig. Es ist nie zu vollständiger Gänze sicher, ob es sich bei einer diagnostizierten MF um eine primäre MF handelt, oder sie nicht doch einer Post-ET oder Post-PV-MF zugeordnet werden muss, wobei die Symptome der PV oder ET vorher nicht zu einem ärztlichen Kontakt geführt haben und somit eine frühzeitige Diagnose verhinderten. Des Weiteren muss der Einschluss des Patient\*innen mit ET kritisch gesehen werden, da Ruxolitinib nicht zur Therapie der ET zugelassen ist, und somit eine off-label-Therapie erfolgt.

Außerdem wurden keine Nebendiagnosen, sowie deren Therapie, erfasst, womit Interaktionen der Medikamente untereinander, die sowohl gleichgerichtet aber auch antagonistisch wirken können, nicht berücksichtigt werden. Auch kann so nicht

## Diskussion

---

ausgeschlossen werden, dass die Wirkungen auf die Funktion der Granulozyten nicht als Nebenwirkung anderer Medikamente auftreten. Eine Auflistung der Prognosescores der Patient\*innen konnte aufgrund des Mangels an Daten ebenfalls nicht oder wenn überhaupt nur sehr lückenhaft erfolgen und entfällt deshalb. Der Mangel begründet sich hier vor allem damit, dass der IPSS die Prognose bei Diagnosestellung der Erkrankung berücksichtigt, aber erst 2009 in dieser Funktion veröffentlicht wurde (67). Bei einer Mehrzahl der Patient\*innen erfolgte die Diagnosestellung aber bereits früher, sodass einige für den IPSS relevante Parameter retrospektiv nicht mehr erhoben werden konnten.

Positiv hervorgehoben werden muss aber, dass auch Patient\*innen in diese Arbeit mit eingeschlossen wurden, die sich nicht an einer Universitätsklinik vorgestellt haben, sondern als Patient\*innen bei niedergelassenen Hämatolog\*innen behandelt werden. So kann zumindest verhindert werden, dass nur, dem klassischen Patientengut einer Uniklinik entsprechend, „schwerer Erkrankte“ berücksichtigt werden. Außerdem zeigt dies die Relevanz der Forschung der Nebenwirkungen von Ruxolitinib auf; das Medikament ist auch bei niedergelassenen Ärzt\*innen verbreitet und damit einem größeren Patient\*innenklientel zugänglich.

In dieser Arbeit wurden gleich zwei Kontrollgruppen festgelegt: Gesunde Proband\*innen und an MPN Erkrankte, die keine Therapie mit Ruxolitinib erhalten. Damit soll auch der Frage Rechnung getragen werden, ob alleinig die Therapie mit Ruxolitinib als JAK-Inhibitor zu den erfassten Ergebnissen führt, oder ob die Zellfunktion auch schon durch die Erkrankung beeinträchtigt ist.

Trotzdem muss man auch die Wahl der Kontrollgruppen kritisch beleuchten: Ebenso wie in der Patient\*innengruppe ist die Anzahl der untersuchten Proband\*innen mit 11 bzw. 12 sehr gering. Zudem wurden die Gruppe der gesunden Probanden zum einen Patient\*innen aufgenommen, die vormals an einer CML litten, zum Zeitpunkt der Blutentnahme allerdings in Remission und ohne CML-spezifische Therapie waren. Bei ihnen ist zwar ein durchgehendes Monitoring und in der Ambulanz der Uniklinik auch leichte Verfügbarkeit sichergestellt, eine optimale Wahl stellen diese Patient\*innen allerdings nicht dar. Die anderen gesunden Patient\*innen stammen aus dem privaten Umfeld der Autorin: Dort kann nicht eindeutig sichergestellt sein, ob diese Patient\*innen nicht an Bluterkrankungen leiden, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme nur noch nicht klinisch offenbar wurden. Deshalb wurden diese

Patient\*innen weiterhin regelmäßig betreut. Bis zur Fertigung dieser Arbeit ist keiner der Patient\*innen neu auftretend und für diese Forschung relevant erkrankt.

Die Verteilung der MPN-Diagnosen in der Kontrollgruppe stellt sich homogener dar als die der Proband\*innen-Gruppe. Allerdings überwiegen hier PV und ET, und mindern damit die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen. Zusätzlich wurde der oben positiv erwähnte Punkt, dass die Patient\*innen auch von niedergelassenen Hämatologen rekrutiert wurden, hier nicht erfüllt: Alle Probanden stammen aus dem Patientengut der Universitätsklinik Mainz. Die oben bereits genannten Punkte, Aufnahme der Nebendiagnosen und weiterer Medikamente, bleiben hier ebenso unberücksichtigt. Allerdings wurden die Pharmaka oder Methoden zur Therapie der jeweiligen MPN betrachtet und Tabelle 24 aufgeschlüsselt.

## **5.2 Ruxolitinib beeinträchtigt die Zellen des Immunsystems in ihrer Funktion**

In der Literatur finden sich einige Untersuchungen zur Wirkung von Ruxolitinib auf Immunzellen. So wurden DCs, NKs und auch T-Lymphozyten auf ihre Funktionen hin bereits untersucht. Dabei stellte sich heraus, wie mannigfaltig Ruxolitinib über die Inhibition des JAK-Rezeptors auf Funktion und auch Differenzierung einwirkt. Für einen groben Überblick siehe dazu auch Abbildung 2.

DCs wurden in den Studien von Heine et al. (111) und Rudolph et al. (112) untersucht. Dort zeigte sich unter Ruxolitinib Einschränkungen in Differenzierung und Entwicklung, sowie des Phänotyps der Zellen. Zusätzlich wurde durch die DCs weniger Moleküle wie IL-12 und kostimulatorische Proteine zur TLR-Simulation produziert. Außerdem bestehen in Anwesenheit von Ruxolitinib eine Verhinderung von Aktivierung der DCs durch LPS, Hemmung der Migration und Verzögerung der viralen Clearance. Zusammenfassend scheinen also Funktion und Zellstoffwechsel der DCs beeinflusst. Dies wurde bereits in 2.2.3 beschrieben. Die Nachweise erfolgten, im Gegensatz zu dieser Arbeit, in beiden Studien nicht an DCs von Patienten, die zur Therapie der MPN Ruxolitinib einnahmen, sondern an Zellen freiwilliger gesunder Proband\*innen, deren DCs gewonnen und kultiviert wurden. Zusätzlich wurden Untersuchungen von DCs im Mausmodell durchgeführt. In allen Tests erfolgte der Zusatz von Ruxolitinib in verschiedenen Konzentrationen, die der

Konzentration von Ruxolitinib im menschlichen Körper entsprechen (146). Dem folgte auch die Auswertung und Analyse der Daten.

Auch NKs wurden unter Einfluss von Ruxolitinib auf ihre Funktion hin bereits untersucht, da auch deren Differenzierung vom JAK/STAT-Signalweg reguliert wird (7). Genauere Informationen sind unter 2.2.3 zu finden. Schönberg et al. (113) untersuchten 28 MPN-Patient\*innen, die zum Teil (n=16) Ruxolitinib einnahmen. Dem stellten sie insgesamt 24 gesunde Proband\*innen gegenüber. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Zahl der NKs ist unter Therapie mit Ruxolitinib reduziert. Dies beruht auf Verhinderung der Ausreifung der Vorläuferzellen der NKs. Dieser Effekt ist allerdings teilweise auch schon bei Patient\*innen mit MPN zu entdecken. Weitere in vitro Versuche an gesunden NK-Zellen, die mit den Konzentrationen von Ruxolitinib im menschlichen Körper versetzt wurden (146), zeigten, dass auch das Lysieren von Zielzellen sowie die Aktivierung durch verschiedene Zytokine und damit Degranulation und IFN- $\gamma$ -Produktion eingeschränkt waren. Allerdings war dies nach Entfernen des Ruxolitinib reversibel (100, 113).

Eine weitere Zellart wurde hinsichtlich ihrer Funktion unter Behandlung mit Ruxolitinib untersucht: T-Lymphozyten. In Studien von Parampalli et al. (115) wurden neun an MF erkrankte Patient\*innen mit Ruxolitinib therapiert und dann deren T-Lymphozyten gewonnen und kultiviert. Dabei zeigte sich, dass die Zahlen von Th1, Th17 und T<sub>reg</sub> durch Verhinderung der Differenzierung vermindert sind. Zusätzlich besteht eine Beeinträchtigung der Zytokinproduktion (115). Auch Keohane et al (116) untersuchten die Auswirkungen von Ruxolitinib auf die T-Lymphozyten. Dabei zeigte sich ebenfalls die von Parampalli et al. festgestellte Verminderung der Zytokinproduktion und auch  $\gamma$ -Ausschüttung, aber auch eine Vermehrung von Th17 nach längerer Dauer der Therapie. Dies könnte auf das Wiedereinsetzen der immunologischen Kontrolle zurückzuführen sein. Auch konnten in vivo und in vitro ein Silencing von T-Helferzellen festgestellt werden. Massa et al. (117) beobachteten, dass die Zahl der zirkulierenden T<sub>reg</sub>, durch die Gabe von Ruxolitinib langfristig verringert bleibt, auch nach Absetzen der Medikation.

Vor einem direkten Vergleich dieser Arbeit mit den soeben dargestellten Studien müssen zunächst die Unterschiede, aber auch Limitationen dieser Arbeit aufgeführt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der neutrophilen Granulozyten an

Blutproben von Patient\*innen, die Ruxolitinib zur Therapie von MPN einnahmen. Der Wirkspiegel von Ruxolitinib, dem die PMN im Blut der Patient\*innen ausgesetzt waren, wurde nicht bestimmt, weshalb nicht mit völliger Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass dieser auch in allen Patient\*innen zumindest ähnlich war. So ist es möglich, dass es auch unterschiedlich zur Beeinflussung der Zellfunktion neutrophiler Granulozyten kommen könnte. Denn die Beeinflussung der Immunzellen, die bereits untersucht wurden, nimmt bei allen mit Steigerung der Dosis an Ruxolitinib, die auf die Zelle einwirkt, zu.

In dieser Arbeit wurden folgende Funktionen der neutrophilen Granulozyten untersucht: Degranulation von CD11b und CD66b, oxidativer burst und phagozytische Aktivität.

CD11b ist ein transmembranes Glykoprotein, auch die Bezeichnungen Komplementrezeptor 3 oder Mac-1 sind möglich, das sich auf viele Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort findet, so zum Beispiel neben Granulozyten auch auf Monozyten (9, 119). Es ist außerdem intrazellulär in den Membranen von sekretorischen Vesikeln, spezifischen und Gelatinase-haltigen Granula zu finden (120). Zusammen mit CD18 ist CD11b ein maßgebender Faktor für die erfolgreiche Adhäsion von PMNs und Monozyten ans Endothel und die Diapedese, zudem vermittelt es die Aktivierung und Phagozytose neutrophiler Granulozyten (147). In der Literatur konnten bereits eine vermehrte Expression von CD11b/CD18 auf neutrophilen Granulozyten von 13 PV- und 18 ET-Patient\*innen im Vergleich zu gesunden Individuen nachgewiesen werden (134). Therapeutisch kam bei diesen Patienten Ruxolitinib nicht zum Einsatz. Dies deckt sich mit den Daten dieser Arbeit. Auch hier wurde die basale Rate, das heißt vor Aktivierung mit LPS, Zymosan und GM-CSF, an CD11b auf der Oberfläche der PMN verglichen. Diese zeigte sich bei MPN-Patienten unter Ruxolitinib-Therapie im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen erniedrigt, allerdings nicht signifikant. Ohne die Einnahme des TKI ist die Degranulation von CD11b erhöht im Vergleich zu gesunden Individuen. Nach Stimulation der PMNs vor allem mit Zymosan zeigte sich die Degranulation, gemessen durch Überexpression von CD11b, von Patient\*innen mit MPN, die nicht unter Therapie mit Ruxolitinib waren, erhöht im Vergleich zu gesunden Proband\*innen. Bislang gab es noch keine Daten zum Einfluss von Ruxolitinib auf die CD11b-Expression neutrophiler Granulozyten von Patient\*innen mit MPN. In

## Diskussion

---

dieser Arbeit zeigte sich die Degranulation von CD11b dieser Patient\*innengruppe vermindert zum einen im Vergleich zu gesunden Proband\*innen, mehr noch aber im Vergleich zu MPN-Patient\*innen, die keine Therapie mit einem JAK-Inhibitor erhielten. Keiner der hier gesehenen Unterschiede war signifikant (siehe dazu auch 5.1.). Dies würde bedeuten, dass die neutrophilen Granulozyten bei MPN-Patienten verstärkt mit dem Gefäßendothel interagieren, und die Phagozytose gesteigert erfolgt. Unter Ruxolitinib wird diese Überaktivierung allerdings herunterreguliert, was zu einer eingeschränkten Immunantwort führen kann.

Ein weiteres, am Adhäsionsprozess neutrophiler Granulozyten beteiligtes und in dieser Arbeit untersuchtes, Membranprotein ist CD66b, auch als Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesionmolecule (CEACAM)-8 bekannt. Es ist mittels Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) in der äußeren Zellmembran, aber auch der Membran der sekundären Granula neutrophiler Granulozyten verankert, und wird nach Stimulation vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert (148, 149). Beteiligt ist CD66b an der Regulierung der Adhäsion von PMN, aber auch Zellmigration und dem Binden von Pathogenen (148). Bislang gibt es keine Daten zur CD66b-Expression in MPN-Patient\*innen oder dieser unter Ruxolitinib-Therapie. In dieser Arbeit zeigte sich die Expression von CD66b bei Patient\*innen, die an MPN erkrankt waren, verringert im Vergleich zu gesunden Proband\*innen. Analog zu den Ergebnissen der CD11b-Expression, zeigte sich unter Stimulation mit LPS und GM-CSF eine vermehrte Expression von CD66b in den PMN von Patient\*innen, die an MPN erkrankt sind, im Vergleich zu gesunden Proband\*innen. MPN-Patient\*innen, die mit Ruxolitinib behandelt werden zeigten allerdings eine verringerte Expression von CD66b, und damit Degranulation, verglichen mit beiden Kontrollgruppen. Unter Stimulation mit Zymosan weicht dies aber ab: Hier exprimierten die PMNs gesunder Patient\*innen mehr CD66b als die von an MPN-Erkrankten. Allerdings zeigen sich in den Rohdaten zu dieser Dissertation stark abweichende Messwerte, die dieses „Abweichen“ von Ergebnissen unter Stimulation mit LPS und GM-CSF erklären könnten. Keiner dieser Unterschiede war statistisch signifikant.

In den FACS-Analysen dieser Arbeit erfolgte auch die Begutachtung des oxidativen burst der PMN. Unter Stimulation mit GM-CSF wurde die höchste Entladung von ROS durch PMNs gesunder Patient\*innen erreicht, gefolgt von MPN-Erkrankten und schließlich Patient\*innen unter Ruxolitinib-Therapie. Dieses Ergebnis, zumindest in



Bezug auf den Vergleich gesunder PMN und MPN-PMN, deckt sich mit den Daten der Literatur (134). Würde man stark abweichende Messwerte aus der Bewertung unter Stimulation mit LPS entfernen, könnte dies dieses Ergebnis stützen. Lediglich unter Stimulation mit Zymosan scheint, bezieht man auch hier die „Ausreißer“ nicht mit ein, zwischen Patient\*innen- und beiden Kontrollgruppen kein Unterschied vorzuliegen.

Wenige Studien haben sich bereits mit der phagozytotischen Funktion neutrophiler Granulozyten von MPN-Erkrankten beschäftigt. Dabei zeigte sich eine uneindeutige Datenlage: Marquetty et al. (150) konnten keine Einschränkung der Phagozytose nachweisen, wohl aber eine vergrößerte Bandbreite im Vergleich zu PMNs gesunder Individuen. Wolach et al. (151) gehen dagegen von einer verminderten phagozytotischen Aktivität aus, teilweise ausgeglichen von einer erhöhten Zahl phagozytischer Zellen (152, 153). In dieser Arbeit zeigten die PMNs von MPN-Patient\*innen unter Stimulation mit GM-CSF und LPS im Vergleich zu gesunden Patient\*innen erhöhte phagozytotische Aktivität, unter Stimulation mit Zymosan verminderte. Betrachtet man die neutrophilen Granulozyten von Patient\*innen unter Ruxolitinib-Therapie war deren phagozytotischer Index im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen erhöht. Dies liegt im Widerspruch zur allgemeinen Annahme, dass die Phagozytose unter Ruxolitinib-Therapie vermindert sei, vor allem im Hinblick auf das gehäufte Auftreten von Infektionen im Vergleich zur Normalbevölkerung. Weiterhin bemerkenswert ist die erhöhte Streubreite der Messergebnisse der Patient\*innengruppe, sowie der Kontrollgruppe an MPN-Erkrankten im Vergleich zu gesunden Proband\*innen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Funktionen und Oberflächenmarker stellen aber natürlich nicht die komplette Bandbreite an Funktionen der PMN dar. So wurde bereits unter 3.2.1 beschrieben, dass die Untersuchung zum CD62L-Shedding aufgrund methodischer Fehler nicht weiter fortgeführt wurde. Weitere nicht untersuchte Funktionen sind beispielsweise die Produktion von IL-8, TREM-1 vermittelte Effektorfunktionen, sowie die NETose (154). Zudem scheint die quantitative Untersuchung der neutrophilen Granulozyten interessant. Durch Ruxolitinib könnte es zu einer Einschränkung im Ausreifen der PMNs kommen, sodass deren absolute Zahl vermindert sein könnte, dies wurde zumindest analog schon für die NKs und Tregs erfasst (113, 115, 117). Andere Zellen des

Immunsystems, in diesem Falle speziell Th17, zeigten nach längerer Therapiedauer mit Ruxolitinib eine Steigerung ihrer Zahl, ein Effekt der ebenso auf neutrophile Granulozyten zutreffen könnte (116). Somit kann eine noch genauere Untersuchung der Einwirkung von Ruxolitinib auf die PMN lohnend sein und möglicherweise weitere Einschränkungen feststellen.

Fasst man die Erkenntnisse aus dieser Arbeit zusammen so behindert eine Inhibition der JAK durch Ruxolitinib die neutrophilen Granulozyten von Patient\*innen mit MPN in der Degranulation sowie dem oxidativen burst. Oberflächenmarker wie CD11b und CD66b sind vermindert exprimiert. Eine Verminderung der Phagozytose konnte mit den Methoden dieser Arbeit nicht nachgewiesen, vielmehr zeigt sich eine erhöhte phagozytotische Aktivität. Natürlich ist ein direkter Vergleich aufgrund unterschiedlicher Nachweismethoden der vorliegenden Studien nur schwer möglich, zumal alle Unterschiede, die in dieser Arbeit gefunden wurden nicht signifikant sind, worauf auch die geringe Patient\*innenzahl Einfluss hat. Trotzdem liefert in Zusammenschau die Gesamtheit der Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von Ruxolitinib auf Zellen des Immunsystems beschäftigen, wichtige Hinweise darauf, wie stark Ruxolitinib in die Funktion des Immunsystems eingreift, stärker als bei Zulassung angenommen (96), und untermauert die Forderung nach antiinfektiver Prophylaxe bei Einnahme von Ruxolitinib (155).

Außerdem wird durch die Unterschiede der PMN-Funktionen und -Oberflächenmarker zwischen gesunden Proband\*innen und MPN-Patient\*innen die These untermauert, dass auch die „normalen“ Zellen, seien es Fibroblasten des Knochenmarks, Endothelzellen oder wie in diesem Fall neutrophile Granulozyten, der Patienten, pathologisch agieren und damit zur Pathogenese der MPN beitragen.

### **5.3 Wer war zuerst da, Inflammation oder Mutation?**

Während oben der Einfluss einer chronischen Inflammation auf die Entstehung der MPN beschrieben ist, bleibt vor allem eine Frage bestehen: Was kam zuerst? Die Inflammation oder die Mutation?

In der Onkologie ist die Inflammation als Ursache für die Tumorgenese solider Tumore schon lange bekannt: Klassische Beispiele sind die Entstehung gastrointestinaler Stromatumore (GIST) nach Infektion mit *Helicobacter pylori* oder kolorektaler Karzinome bei Patient\*innen mit chronisch entzündlichen

## Diskussion

---

Darmerkrankungen. Chronische Inflammation stimuliert Epithelzellen und Makrophagen zur Freisetzung proliferativer Zytokine. Durch eine Erhöhung der Proliferation ist eine Mutation in Stammzellen, die zu Hyperplasie führt, wahrscheinlicher. Akkumulieren viele dieser Mutationen in einer Zelle ist der Weg zur Entstehung einer Neoplasie frei (10).

Übertragen wir diesen Ansatz auf die Entstehung der MPN:

Verschiedene Umweltfaktoren sprechen dafür: Rauchen und Autoimmunerkrankungen sind mit dem Erkranken an MPN assoziiert (30, 32-35). Beide wiederum sind bekannt dafür, auch zu chronischer Inflammation zu führen. Zudem sind Autoimmunphänomene, wie die Bildung von Antikörpern gegen rote Blutkörperchen oder anti-mitochondriale Antikörper, bei MF-Patient\*innen bekannt (35). Dadurch kommt es zu erhöhtem Zellumsatz und damit auch gesteigerter Zellteilung, was analog zur Tumorgenese solider Tumore zu einer erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit des Genoms der Zellen führt (10).

MPN sind Erkrankungen des alten Menschen. Das Älterwerden gilt als profinflammatorisch, da im Alter vermehrt inflammatorische Zytokine freigesetzt werden und die Immunoseneszenz einsetzt, also ein Nachlassen der Funktionsfähigkeit des Immunsystems (28).

Auch die Bedeutung einiger inflammatorischer Zytokine konnte bereits herausgestellt werden. So ist ohne TNF $\alpha$  und LCN-2 die Vermehrung von JAK2V617-mutierten Zellklonen deutlich limitiert (36, 41-43), TGF $\beta$  scheint eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Knochenmarksfibrose zu spielen (10). Auch IL-8 fördert das Überleben der mutierten Zellklone und konnte gar als prädiktiver Marker für das Gesamt-Überleben identifiziert werden (10, 29). Weitere relevante inflammatorische Marker sind in

Tabelle 3 aufgeführt. Diese Zytokine werden wie bereits oben beschrieben zum Teil durch die mutierten Zellen selbst vermehrt exprimiert, dies gilt beispielsweise für TNF $\alpha$ , oder von den umliegenden Wildtyp-Zellen, wie TGF $\beta$  (37). Auch wurden

erhöhte Level an ROS in MPN-Zellen nachgewiesen (40, 46, 47). All dies zeigt, dass ohne Inflammation kein Selektionsvorteil für die mutierten Zellen besteht.

Betrachtet man weiterhin  $\text{TNF}\alpha$ , konnten Lai et al. dem weitere Informationen hinzufügen (156): So produzierten Monozyten von MPN-Patienten verlängert  $\text{TNF}\alpha$  nach Stimulation des TLR sowohl in den mutierten Zellklonen, als auch den Wild-Typ-Zellen. Dies zeigten auch Monozyten eines gesunden eineiigen Zwillings eines MPN-Patienten, bei dem keine mutierten Zellklone nachzuweisen waren (28, 156).

Wie bereits oben erwähnt sind inflammatorische Signalwege sowohl in den Zellen, die JAK2V617F-Mutationen aufweisen, erhöht, als auch in Zellen derselben Individuen, die keine Mutation aufweisen (37). Weiterhin zeigten Kleppe et al. (38) im Mausmodell, dass Wildtyp-Zellen, die JAK2-Mutanten ausgesetzt waren, auch nach Transplantation in gesunde Tiere, verschiedene Entzündungsmarker überexprimieren, darunter  $\text{TNF}\alpha$  und IL6. Also sind auch die scheinbar gesunden Zellen der MPN Patienten schon auf Inflammation gepolt. Koschmieder et al. (27) ziehen daraus den Schluss, dass die mutierten Zellen die gesunden beeinflussen. Es wäre aber auch denkbar, dass diese Überexpression inflammatorischer Zytokine in den Wildtyp-Zellen bereits vor der Mutation besteht.

Trotzdem gilt zu beachten, dass die Entzündung auch durch dauerhafte Aktivierung inflammatorischer Signalwege in den mutierten Zellklonen selbst hervorgerufen wird (27, 37). Die Mutation führt in den MPN aber nicht dazu, wie beispielsweise im Falle der CML, dass ein verändertes Genprodukt, sprich ein messbares Protein entsteht. Somit sind die Inflammation durch die mutierten Zellklone und die chronische Inflammation nicht zu unterscheiden. Ein endgültiger Beweis, dass chronische Entzündung zur Mutation führt, und diese nicht nur ein Nebenprodukt der Mutation ist, konnte bis jetzt nicht erfolgen. Dazu sind Mausmodelle nötig, denn in MPN-Patient\*innen selbst, ist es schwierig diese Hypothese zu prüfen, unter anderem auch, weil MPN seltene Erkrankungen sind und bisher keine speziellen Risikofaktoren identifiziert werden konnten (10, 52, 59, 69).

Weiterhin ergibt sich daraus die Frage der klinischen Relevanz. Denn beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Einnahme von NSAID, also eine antiinflammatorische Therapie, das Risiko an Kolonkarzinomen zu versterben, senkt (157). Trotzdem, und auch trotz der Häufigkeit von Darmkrebs, gibt es keine

generelle Empfehlung der Fachgesellschaften NSAIDs einzunehmen. Warum sollte sich dies also bei den viel selteneren MPN ändern?

## 5.4 Ruxolitinib gegen die Inflammation

Ruxolitinib inhibiert Januskinasen und therapiert die MPN damit in doppeltem Sinne:

Über die Hemmung der JAK1 werden proinflammatorische Signalwege vermindert, und damit Inflammation reduziert, über die JAK2 findet eine Verminderung der Überexpression hämatopoietischer Signalkaskaden statt (96).

Allerdings ist der JAK/STAT-Signalweg nicht der einzige, der zur Inflammation in MPN beiträgt. Wäre dem so, würde eine Therapie mit Ruxolitinib ausreichen, um eine Normalisierung der inflammatorischen Zytokine zu erreichen. Fisher et al. untersuchten verschiedene Zytokinlevel bei MF Patient\*innen vor und nach Ruxolitinib-Gabe. Dabei konnte eine JAK-Inhibition allerdings nur moderate Senkungen der Level von beispielsweise VEGF, TNF $\alpha$ , IL-8 oder IL-6 erreichen (158). Somit ist scheint eine reine JAK-Inhibition nicht zur Minderung der Inflammation in MPN ausreichend.

In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die NF $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege an der Aufrechterhaltung des hohen Levels an inflammatorischen Zytokinen beteiligt zu sein scheinen (158). Vor allem der Einfluss von NF $\kappa$ B mutet interessant an: Kleppe et al. (159) dämpften die Signalkaskade und wiesen in Kombination mit Ruxolintib eine Verminderung an inflammatorische Zytokinen, aber auch an Krankheitslast in MPN-Mausmodellen nach. Zusätzlich konnte eine bereits aufgetretene Knochenmarksfibrose rückgängig gemacht werden (159). Daraus lässt sich schließen, dass die antiinflammatorische Potenz von Ruxolitinib mit einer Kombinationstherapie gesteigert werden kann. Zudem scheint dann eine Dosisreduktion der jeweiligen Kombinationspartner möglich, ähnlich wie es bereits in der Antibiotikatherapie erfolgt, um die Nebenwirkungen der Substanzen zu mindern. In Bezug auf Ruxolitinib ist damit zwar nicht die Senkung infektiologischer Nebenwirkungen beeinflusst, denn diese korreliert nicht mit der Dosis, vielmehr aber die gefürchtete Myelosuppression (110). Auch denkbar wären die Verminderung von Blutungen, sowie die Senkung des Einflusses auf den systolischen Blutdruck und die

Lipasewerte. Aktuell laufen laut „ClinicalTrials.gov“ zahlreiche verschiedene Studien, die Wirkstoffkombinationen mit Ruxolitinib untersuchen.

Die Einschränkung der antiinfektiven Funktion der neutrophilen Granulozyten oder auch anderer Immunzellen durch Ruxolitinib im Vergleich zu anderen Therapien der MPN, wurde bisher eher unter dem Gesichtspunkt beschrieben, dass es zu schwerwiegenden Problemen in der Behandlung kommt: Es treten vermehrt Infektionen auf. Im Hinblick auf den Einfluss der PMN auf die Pathogenese der MPN stellen sich aber auch Chancen dar: In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ruxolitinib den oxidativen burst von PMN mindert, also die Freisetzung der ROS, die als Teil der Inflammation gesehen werden. Zusätzlich erscheint es möglich, dass die Minderung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten durch Ruxolitinib das Auftreten Thrombosen senken kann. Der Einfluss der NETose stellte sich in Studien nicht eindeutig dar, was unter anderem damit begründet wurde, dass verschiedene Studienteilnehmer\*innen mit JAK-Inhibitoren vorbehandelt waren (140). Auch das Entstehen der Knochenmarkfibrose scheint durch PMN beeinflusst (44). Eine Blockade der Funktion neutrophiler Granulozyten könnte also auch positiven Einfluss auf das Fortschreiten der MPN üben.

Ein weiterer Aspekt ist in Bezug auf Ruxolitinib zu bedenken. Die Zulassung erfolgte zur Behandlung krankheitsbedingter Splenomegalie oder Symptomen bei Erwachsenen mit primärer MF, aber auch Post-PV-MF oder Post-ET-MF. Zusätzlich wird es zur Behandlung von PV-Patienten eingesetzt, die resistent oder intolerant gegenüber Hydroxyurea sind (5). Vor allem in der PV wird es im Therapieverlauf also erst relativ spät eingesetzt, was häufig zur Folge hat, dass eine Wandlung in eine MF bereits eingeleitet ist. Wenn sich Inflammation tatsächlich als Treiber der Erkrankungen herausstellen sollte, wäre es möglicherweise sinnvoll, die Ruxolitinib-Therapie früher einzuleiten, um den Teufelskreis aus Inflammation und Mutation zu durchbrechen. Auch hier bedarf es allerdings weiterer, am besten randomisiert-kontrollierter, doppelt-verblindeter, Studien.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die myeloproliferativen Neoplasien sind gekennzeichnet durch die drei Treibermutationen im JAK-, CALR- und MPL-Gen. Diese führen zur ungehemmten Proliferation hämatopoietischer Stammzellen, sodass eine Vielzahl an reifen Blutzellen ins periphere Blut ausgeschwemmt wird (1, 2, 4). Zusätzlich kommt es zu einer Steigerung der Inflammation, die ein entscheidender Faktor für die Ausbreitung der mutierten Zellklone darstellt (27, 37, 40). Ruxolitinib wirkt durch Inhibition der Januskinase regulierend sowohl auf die übermäßige Hämatopoiese, als auch gegen die vermehrte Aktivierung proinflammatorische Signalkaskaden, und stellt damit ein potentes Mittel in der Therapie von PMF und PV dar. Nach Zulassung im Jahre 2012 folgten aber einige Berichte über das Auftreten von Infektionen unter Therapie von Ruxolitinib (6). In Untersuchungen von DCs, NKs und verschiedener T-Lymphozyten erfolgte der Nachweis, dass Ruxolitinib diese Zellen in der Ausübung ihrer Funktion beeinträchtigte. Folglich setzte sich diese Dissertation zum Ziel, neue Erkenntnisse über die Funktion neutrophiler Granulozyten unter Ruxolitinib zu erarbeiten.

Mit der Unterschrift einer Einverständniserklärung erklärten sich dreizehn Patient\*innen, die Ruxolitinib zur Therapie einer MPN einnahmen, sowie zwölf gesunde Proband\*innen, als auch elf MPN-Erkrankte, die nicht mit Ruxolitinib behandelt wurden, zur Abgabe von peripheren, heparinisierten Vollblutproben bereit. Aus diesen wurde zum einen die Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD66b auf den neutrophilen Granulozyten, zum andern, nach Stimulation dieser Proben mit Zymosan, LPS und GM-CSF, die Funktionen der PMN bestimmt. Dazu erfolgten die Messung des oxidativen burst, der phagozytotischen Aktivität sowie der Degranulation von CD11b und CD66b mittels FACS.

Keine der untersuchten Oberflächenmarker oder Effektorfunktionen zeigte statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Patient\*innengruppe und/oder den Kontrollgruppen. Die Expression von CD11b auf PMN scheint unter Einwirken von Ruxolitinib vermindert. Tendenziell zeigen die neutrophilen Granulozyten von MPN-Patienten, die nicht mit Ruxolitinib behandelt wurden, eine vermehrte Degranulation nach Stimulation. Unter Ruxolitinib ist diese vermindert, auch im Vergleich zu gesunden Patient\*innen. Die phagozytotische Aktivität scheint im Vergleich zu gesunden Proband\*innen vermehrt, ein Umstand, der nur gering negativ von Ruxolitinib beeinträchtigt wird. Zuletzt zeigte sich auch eine Verminderung des

## Zusammenfassung und Ausblick

oxidativen burst durch Ruxolitinib, während MPN-Patient\*innen ohne Ruxolitinib erhöhte Raten an oxidativem burst zeigten.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere die Daten zur Degranulation, eine Veränderung der Funktion neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu PMN von Gesunden. Dies untermauert die Forderung nach antiinfektiver Prophylaxe unter Therapie mit Ruxolitinib. Da aber bei weitem nicht alle Funktionen der PMN überprüft und getestet wurden, bleibt weiterhin die Forderung nach größeren und umfassenderen Studien bestehen.

Ferner erfolgte die Diskussion der Chancen, die die Therapie mit Ruxolitinib bietet, vor allem in Hinblick auf die immer relevanter werdende Rolle der Inflammation in der Pathogenese der MPN. Zwar konnten diesem Thema keine entscheidenden Aspekte hinzugefügt werden, die Bemühungen zur Suche nach Kombinationspartnern zu Ruxolitinib werden aber befürwortet. Denn diese haben das Potential sowohl die Lebensqualität, aber auch die Lebenserwartung von MPN-Patient\*innen deutlich zu verbessern.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
2. Lengfelder E, Griebhammer M, Petrides PE. Myeloproliferative Neoplasien (MPN) (früher: Chronische Myeloproliferative Erkrankungen (CMPE)) 2019 [21.07.2020]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myeloproliferative-neoplasien-mpn-frueher-chronische-myeloproliferative-erkrankungen-cmpe/@@guideline/html/index.html>.
3. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2168-81.
4. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol*. 2015;1(1):97-105.
5. Pharma N. Fachinformation Jakavi® 2020 [Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jakavi-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jakavi-epar-product-information_en.pdf)].
6. Lussana F, Cattaneo M, Rambaldi A, Squizzato A. Ruxolitinib-associated infections: A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol*. 2018;93(3):339-47.
7. Elli EM, Baratè C, Mendicino F, Palandri F, Palumbo GA. Mechanisms Underlying the Anti-inflammatory and Immunosuppressive Activity of Ruxolitinib. *Front Oncol*. 2019;9:1186.
8. Müller-Esterl W. Biochemie : Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger. 3rd ed. 2018 ed. Berlin, Heidelberg 2018.
9. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):638-50.
10. Jutzi JS, Pahl HL. The Hen or the Egg: Inflammatory Aspects of Murine MPN Models. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:101987.
11. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Overview of the myeloproliferative neoplasms 2019 [23.07.2020]. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-myeloproliferative-neoplasms/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-myeloproliferative-neoplasms/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).
12. Kraywinkel K. Epidemiologie der myeloproliferativen Neoplasien und myelodysplastischen Syndrome in Deutschland. *Der Onkologe*. 2019;25(11):948-56.
13. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, Helgadóttir EA, Samuelsson J, Björkholm M. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood*. 2008;112(6):2199-204.
14. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Clinical manifestations and diagnosis of polycythemia vera 2020 [23.07.2020]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of->

polycythemia-

vera/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4511&source=see\_link.

15. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2015;43(8):599-608.
16. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-90.
17. Van Etten RA, Larson RA, AG R. Clinical manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia 2020 [Available from: [https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-chronic-myeloid-leukemia?search=CML&topicRef=4511&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-chronic-myeloid-leukemia?search=CML&topicRef=4511&source=see_link)].
18. Hochhaus A, Baerlocher GM, Brümmendorf TH, le Coutre P, Metzler M, Petzer A, et al. Chronische Myeloische Leukämie (CML) 2018 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myeloische-leukaemie-cml/@@guideline/html/index.html>].
19. O'Sullivan JM, Harrison CN. JAK-STAT signaling in the therapeutic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;451:71-9.
20. Tibes R, Bogenberger JM, Benson KL, Mesa RA. Current outlook on molecular pathogenesis and treatment of myeloproliferative neoplasms. *Mol Diagn Ther*. 2012;16(5):269-83.
21. Grinfeld J, Godfrey AL. After 10years of JAK2V617F: Disease biology and current management strategies in polycythaemia vera. *Blood Rev*. 2017;31(3):101-18.
22. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu R-I, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-35.
23. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667-79.
24. McPherson S, McMullin MF, Mills K. Epigenetics in Myeloproliferative Neoplasms. *J Cell Mol Med*. 2017;21(9):1660-7.
25. Zoi K, Cross NC. Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):947-54.
26. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Finke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2020;189(2):291-302.
27. Koschmieder S, Chatain N. Role of inflammation in the biology of myeloproliferative neoplasms. *Blood Rev*. 2020;42:100711.
28. Mendez Luque LF, Blackmon AL, Ramanathan G, Fleischman AG. Key Role of Inflammation in Myeloproliferative Neoplasms: Instigator of Disease Initiation, Progression. and Symptoms. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(3):145-53.
29. Hermouet S, Bigot-Corbel E, Gardie B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:145293.

30. Kroll ME, Murphy F, Pirie K, Reeves GK, Green J, Beral V. Alcohol drinking, tobacco smoking and subtypes of haematological malignancy in the UK Million Women Study. *Br J Cancer*. 2012;107(5):879-87.
31. Leal AD, Thompson CA, Wang AH, Vierkant RA, Habermann TM, Ross JA, et al. Anthropometric, medical history and lifestyle risk factors for myeloproliferative neoplasms in the Iowa Women's Health Study cohort. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1741-50.
32. Lindholm Sørensen A, Hasselbalch HC. Smoking and philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. 2016;97(1):63-9.
33. Jayasuriya NA, Kjaergaard AD, Pedersen KM, Sørensen AL, Bak M, Larsen MK, et al. Smoking, blood cells and myeloproliferative neoplasms: meta-analysis and Mendelian randomization of 2-3 million people. *Br J Haematol*. 2020;189(2):323-34.
34. Hasselbalch HC. Smoking as a contributing factor for development of polycythemia vera and related neoplasms. *Leuk Res*. 2015.
35. Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010;95(7):1216-20.
36. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S, et al. TNF $\alpha$  facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6392-8.
37. Rodriguez-Meira A, Buck G, Clark SA, Povinelli BJ, Alcolea V, Louka E, et al. Unravelling Intratumoral Heterogeneity through High-Sensitivity Single-Cell Mutational Analysis and Parallel RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2019;73(6):1292-305.e8.
38. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, Riester M, Keller M, Bastian L, et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov*. 2015;5(3):316-31.
39. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1356-63.
40. Chatain N, Koschmieder S, Jost E. Role of Inflammatory Factors during Disease Pathogenesis and Stem Cell Transplantation in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
41. Allegra A, Alonci A, Bellomo G, Campo S, Cannavò A, Penna G, et al. Increased serum levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(1):101-7.
42. Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, et al. JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood*. 2014;124(19):2996-3006.
43. Lu M, Xia L, Liu YC, Hochman T, Bizzari L, Aruch D, et al. Lipocalin produced by myelofibrosis cells affects the fate of both hematopoietic and marrow microenvironmental cells. *Blood*. 2015;126(8):972-82.

44. Kiem D, Wagner S, Magnes T, Egle A, Greil R, Melchardt T. The Role of Neutrophilic Granulocytes in Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17).
45. Bjørn ME, Hasselbalch HC. The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:648090.
46. Merlinsky TR, Levine RL, Pronier E. Unfolding the Role of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasm Pathogenesis. *Clin Cancer Res.* 2019;25(10):2956-62.
47. Marty C, Lacout C, Droin N, Le Couédic JP, Ribrag V, Solary E, et al. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia.* 2013;27(11):2187-95.
48. Baumeister J, Chatain N, Hubrich A, Maié T, Costa IG, Denecke B, et al. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a new therapeutic target in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2020;34(4):1062-74.
49. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(3):164-72.
50. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100(7):2292-302.
51. Schiffer CA, Atallah MDE, Larson RA, AG R. Overview of the treatment of chronic myeloid leukemia 2020 [Available from: [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-chronic-myeloid-leukemia?search=CML&topicRef=4543&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-chronic-myeloid-leukemia?search=CML&topicRef=4543&source=see_link)].
52. Lengfelder E, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H, Gießhammer M, Koschmieder S, et al. Polycythaemia Vera (PV) 2019 [updated 04.2019;21.07.2020]. Available from: [https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/polycythaemia-vera-pv/@\\_@guideline/html/index.html](https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/polycythaemia-vera-pv/@_@guideline/html/index.html).
53. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia.* 2013;27(9):1874-81.
54. Anía BJ, Suman VJ, Sobell JL, Codd MB, Silverstein MN, Melton LJ, 3rd. Trends in the incidence of polycythemia vera among Olmsted County, Minnesota residents, 1935-1989. *Am J Hematol.* 1994;47(2):89-93.
55. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Prognosis and treatment of polycythemia vera 2019 [23.07.2020]. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4517&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4517&source=see_link).
56. Torgano G, Mandelli C, Massaro P, Abbiati C, Ponzetto A, Bertinieri G, et al. Gastroduodenal lesions in polycythaemia vera: frequency and role of *Helicobacter pylori*. *Br J Haematol.* 2002;117(1):198-202.
57. Najean Y, Rain JD. The very long-term evolution of polycythemia vera: an analysis of 318 patients initially treated by phlebotomy or 32P between 1969 and 1981. *Semin Hematol.* 1997;34(1):6-16.
58. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Diagnosis and clinical manifestations of essential thrombocythemia 2018 [26.07.2020]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-and-clinical-manifestations-of->

essential-

thrombocythemia/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4486&source=see\_link.

59. Petrides PE, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H, Grieshammer M, Koschmieder S, et al. Essentielle (oder primäre) Thrombozythämie (ET) 2018 [21.07.2020]. Available from:

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/essentielle-oder-primare-thrombozythaemie-et/@@guideline/html/index.html>.

60. Srour SA, Devesa SS, Morton LM, Check DP, Curtis RE, Linet MS, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br J Haematol.* 2016;174(3):382-96.

61. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol.* 2005;131(2):208-13.

62. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Prognosis and treatment of essential thrombocythemia 2019 [23.07.2020]. Available from:

[https://www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-essential-thrombocythemia/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4511&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/prognosis-and-treatment-of-essential-thrombocythemia/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4511&source=see_link).

63. Barbui T, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A, et al. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer J.* 2015;5(11):e369.

64. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol.* 1999;61(1):10-5.

65. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Clinical manifestations and diagnosis of primary myelofibrosis 2018 [23.07.2020]. Available from:

[https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-primary-myelofibrosis/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4511&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-primary-myelofibrosis/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4511&source=see_link).

66. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Prognosis of primary myelofibrosis 2019 [26.07.2020]. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/prognosis-of-primary-](https://www.uptodate.com/contents/prognosis-of-primary-myelofibrosis?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4529&source=see_link)

[myelofibrosis?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4529&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/prognosis-of-primary-myelofibrosis?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4529&source=see_link).

67. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895-901.

68. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood.* 2010;115(4):778-82.

69. Grieshammer M, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H, Koschmieder S, Petrides PE, et al. Primäre Myelofibrose (PMF) 2018 [21.07.2020]. Available from:

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/primaere-myelofibrose-pmf/@@guideline/html/index.html>.

70. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001;98(12):3249-55.
71. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol*. 2005;128(1):42-8.
72. Tefferi A, Larson R, Rosmarin A. Management of primary myelofibrosis 2020 [26.07.2020]. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/management-of-primary-myelofibrosis/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4529&source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/management-of-primary-myelofibrosis/print?search=myeloproliferatives%20neoplasma&topicRef=4529&source=see_link).
73. Kröger N, Giorgino T, Scott BL, Ditschkowski M, Alchalby H, Cervantes F, et al. Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. *Blood*. 2015;125(21):3347-50; quiz 64.
74. Pernerstorfer T, Stohlawetz P, Stummvoll G, Kapiotis S, Szekeres T, Eichler HG, et al. Low-dose aspirin does not lower in vivo platelet activation in healthy smokers. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1229-31.
75. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013;368(1):22-33.
76. Barbui T, Masciulli A, Marfisi MR, Tognoni G, Finazzi G, Rambaldi A, et al. White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: a subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood*. 2015;126(4):560-1.
77. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):799-807.
78. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787-98.
79. Cervantes F, Pereira A. Does ruxolitinib prolong the survival of patients with myelofibrosis? *Blood*. 2017;129(7):832-7.
80. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoop L, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. 2016;30(8):1701-7.
81. Bryan JC, Verstovsek S. Overcoming treatment challenges in myelofibrosis and polycythemia vera: the role of ruxolitinib. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(6):1125-42.
82. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(5):426-35.
83. Yacoub A, Mascarenhas J, Kosiorek H, Prchal JT, Berenzon D, Baer MR, et al. Pegylated interferon alfa-2a for polycythemia vera or essential thrombocythemia resistant or intolerant to hydroxyurea. *Blood*. 2019;134(18):1498-509.

84. Ianotto JC, Chauveau A, Boyer-Perrard F, Gyan E, Laribi K, Cony-Makhoul P, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- $\alpha$ 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103(3):438-46.
85. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(26):2511-21.
86. Hjorth-Hansen H, Stentoft J, Richter J, Koskenvesa P, Höglund M, Dreimane A, et al. Safety and efficacy of the combination of pegylated interferon- $\alpha$ 2b and dasatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2016;30(9):1853-60.
87. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720-8.
88. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012;120(6):1197-201.
89. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, Li CY, Schwager S, Wu W, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*. 2007;21(2):270-6.
90. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(2):159-66.
91. Pfirrmann M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016;30(1):48-56.
92. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-84.
93. Geelen IGP, Sandin F, Thielen N, Janssen J, Hoogendoorn M, Visser O, et al. Validation of the EUTOS long-term survival score in a recent independent cohort of "real world" CML patients. *Leukemia*. 2018;32(10):2299-303.
94. Jeon JY, Sparreboom A, Baker SD. Kinase Inhibitors: The Reality Behind the Success. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(5):726-30.
95. Kunick C, Egert-Schmidt AM. [The short history of protein kinase inhibitors. New, competitive, successful]. *Pharm Unserer Zeit*. 2008;37(5):360-8.
96. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshour T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109-17.
97. Pavithran K, Pande SB. Janus kinase inhibitors: jackpot or potluck? *Oncol Rev*. 2012;6(1):e13.

98. Plosker GL. Ruxolitinib: a review of its use in patients with myelofibrosis. *Drugs*. 2015;75(3):297-308.
99. Warmuth M, Kim S, Gu XJ, Xia G, Adrián F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(1):55-60.
100. McLornan DP, Khan AA, Harrison CN. Immunological Consequences of JAK Inhibition: Friend or Foe? *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(4):370-9.
101. Maschmeyer G, De Greef J, Mellinshoff SC, Nosari A, Thiebaut-Bertrand A, Bergeron A, et al. Infections associated with immunotherapeutic and molecular targeted agents in hematology and oncology. A position paper by the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL). *Leukemia*. 2019;33(4):844-62.
102. Chen YY, Huang CE, Lee KD, Chen CC. Clinical efficacy and safety of ruxolitinib in the management of myelofibrosis: A single institution experience in Taiwan. *Hematology*. 2016;21(1):3-9.
103. Lee SC, Feenstra J, Georghiou PR. Pneumocystis jiroveci pneumonitis complicating ruxolitinib therapy. *BMJ Case Rep*. 2014;2014.
104. Abidi MZ, Haque J, Varma P, Olteanu H, Guru Murthy GS, Dhakal B, et al. Reactivation of Pulmonary Tuberculosis following Treatment of Myelofibrosis with Ruxolitinib. *Case Rep Hematol*. 2016;2016:2389038.
105. Kusano Y, Terui Y, Ueda K, Hatake K. Klebsiella pneumoniae primary liver abscess associated with ruxolitinib. *Ann Hematol*. 2016;95(9):1561-2.
106. von Hofsten J, Johnsson Forsberg M, Zetterberg M. Cytomegalovirus Retinitis in a Patient Who Received Ruxolitinib. *N Engl J Med*. 2016;374(3):296-7.
107. Wathes R, Moule S, Milojkovic D. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with ruxolitinib. *N Engl J Med*. 2013;369(2):197-8.
108. Kusano Y, Terui Y, Ueda K, Hatake K. Epstein-Barr virus gastric ulcer associated with ruxolitinib. *Ann Hematol*. 2016;95(10):1741-2.
109. Kerget B, Araz O, Ucar EY, Akgun M, Saglam L. Acute respiratory distress syndrome; A rare complication caused by usage of ruxolitinib. *Respir Med Case Rep*. 2017;22:243-5.
110. Polverelli N, Palumbo GA, Binotto G, Abruzzese E, Benevolo G, Bergamaschi M, et al. Epidemiology, outcome, and risk factors for infectious complications in myelofibrosis patients receiving ruxolitinib: A multicenter study on 446 patients. *Hematol Oncol*. 2018.
111. Heine A, Held SA, Daecke SN, Wallner S, Yajnanarayana SP, Kurts C, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122(7):1192-202.
112. Rudolph J, Heine A, Quast T, Kolanus W, Trebicka J, Brossart P, et al. The JAK inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell migration via off-target inhibition of ROCK. *Leukemia*. 2016;30(10):2119-23.
113. Schönberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Parampalli Yajnanarayana S, Cornez I, Hejazi M, et al. JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Res*. 2015;75(11):2187-99.
114. Manduzio P. Ruxolitinib in myelofibrosis: to be or not to be an immune disruptor. *Ther Clin Risk Manag*. 2017;13:169-77.



## Literaturverzeichnis

---

115. Parampalli Yajnanarayana S, Stübig T, Cornez I, Alchalby H, Schönberg K, Rudolph J, et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2015;169(6):824-33.
116. Keohane C, Kordasti S, Seidl T, Perez Abellan P, Thomas NS, Harrison CN, et al. JAK inhibition induces silencing of T Helper cytokine secretion and a profound reduction in T regulatory cells. *Br J Haematol*. 2015;171(1):60-73.
117. Massa M, Rosti V, Campanelli R, Fois G, Barosi G. Rapid and long-lasting decrease of T-regulatory cells in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Leukemia*. 2014;28(2):449-51.
118. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004651.
119. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol*. 2008;15:118-46.
120. Schmidt CS. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Myelodysplastischem Syndrom mittels Durchflusssytometrie 2015.
121. Futosi K, Mocsai A. Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol Rev*. 2016;273(1):121-39.
122. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):402.
123. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99(2):618-26.
124. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007;219:88-102.
125. Teng TS, Ji AL, Ji XY, Li YZ. Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res*. 2017;2017:9671604.
126. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:765-92.
127. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev*. 2016;273(1):180-93.
128. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*. 2002;416(6878):291-7.
129. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013;210(7):1283-99.
130. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
131. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(3):159-75.

132. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2019;26(3):395-408.
133. Boiocchi L, Gianelli U, Iurlo A, Fend F, Bonzheim I, Cattaneo D, et al. Neutrophilic leukocytosis in advanced stage polycythemia vera: hematopathologic features and prognostic implications. *Mod Pathol.* 2015;28(11):1448-57.
134. Burgaleta C, González N, César J. Increased CD11/CD18 expression and altered metabolic activity on polymorphonuclear leukocytes from patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Acta Haematol.* 2002;108(1):23-8.
135. Gupta N, Edelmann B, Schnoeder TM, Saalfeld FC, Wolleschak D, Kliche S, et al. JAK2-V617F activates  $\beta$ 1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule 1. *Leukemia.* 2017;31(5):1223-6.
136. Edelmann B, Gupta N, Schnoeder TM, Oelschlegel AM, Shahzad K, Goldschmidt J, et al. JAK2-V617F promotes venous thrombosis through  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 integrin activation. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4359-71.
137. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2005;33(5):523-30.
138. Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, Domingo A, Villamor N, Colomer D, et al. Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann Hematol.* 2008;87(4):269-76.
139. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol.* 2005;42(4):239-47.
140. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med.* 2018;10(436).
141. Ferrer-Marín F, Cuenca-Zamora EJ, Guijarro-Carrillo PJ, Teruel-Montoya R. Emerging Role of Neutrophils in the Thrombosis of Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3).
142. Cashell AW, Buss DH. The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann Hematol.* 1992;64(6):273-6.
143. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood.* 2000;96(4):1342-7.
144. Slezak S, Jin P, Caruccio L, Ren J, Bennett M, Zia N, et al. Gene and microRNA analysis of neutrophils from patients with polycythemia vera and essential thrombocytosis: down-regulation of micro RNA-1 and -133a. *J Transl Med.* 2009;7:39.
145. G. R. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. Zelluläre Diagnostik Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Sack U,

Tárnok A,

Rothe G; 2007. p. 27-70.

146. Shilling AD, Nedza FM, Emm T, Diamond S, McKeever E, Punwani N, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of [14C]INCB018424, a selective Janus tyrosine kinase 1/2 inhibitor, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(11):2023-31.
147. Stewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(5):690-6.
148. van Rees DJ, Szilagyi K, Kuijpers TW, Matlung HL, van den Berg TK. Immunoreceptors on neutrophils. *Semin Immunol.* 2016;28(2):94-108.
149. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-21.
150. Marquetty C, Labro-Bryskier MT, Perianin A, Hakim J. Impaired metabolic activity of phagocytosing neutrophils in agnogenic osteomyelofibrosis with splenomegaly: a longitudinal study. *Am J Hematol.* 1984;16(3):243-54.
151. Wolach B, Gavrieli R, Manor Y, Lishner M. Leukocyte function in chronic myeloproliferative disorders. *Blood Cells Mol Dis.* 1998;24(4):544-51.
152. Corberand J, LaHarrague P, De Larrard B, Nguyen F, Pris J. Phagocytosis in myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 1980;74(3):301-5.
153. Brandt L. Adhesiveness to Glass and Phagocytic Activity of Neutrophilic Leukocytes in Myeloproliferative Diseases. *Scand J Haematol.* 1965;2:126-36.
154. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
155. Heine A, Brossart P, Wolf D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? *Blood.* 2013;122(23):3843-4.
156. Lai HY, Brooks SA, Craver BM, Morse SJ, Nguyen TK, Haghighi N, et al. Defective negative regulation of Toll-like receptor signaling leads to excessive TNF- $\alpha$  in myeloproliferative neoplasm. *Blood Adv.* 2019;3(2):122-31.
157. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW, Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med.* 1991;325(23):1593-6.
158. Fisher DAC, Miner CA, Engle EK, Hu H, Collins TB, Zhou A, et al. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NF $\kappa$ B signaling. *Leukemia.* 2019;33(8):1978-95.
159. Kleppe M, Koche R, Zou L, van Galen P, Hill CE, Dong L, et al. Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell.* 2018;33(1):29-43.e7.

## 8 Anhang

Tabelle 25: DIPSS-Score: Faktoren und Gewichtung der Einzelparameter nach Grießhammer et al. (69)

	Score Werte		
Prognostische Variablen	0	1	2
Alter (Jahre)	≤65	>65	
Leukozyten (G/l)	≤25	>25	
Hb (g/dl)	≥10		<10
Blasten im PB (%)	<1	≥1	
Konstitutionelle Symptome	Nein	Ja	

Tabelle 26: Prognostische Einteilung des DIPPS Scores nach Grießhammer et al. (69)

Prognosegruppe	Anzahl von Punkten
Niedrigrisiko	0
Intermediärrisiko 1	1-2
Intermediärrisiko 2	3-4
Hochrisiko	5-6

Tabelle 27: DIPPS-plus Score: Faktoren und Gewichtung der Einzelparameter nach Grießhammer et al. (69)

Variable	Score Wert Punkte
IPSS Niedrigrisiko	0
IPSS Intermediärrisiko 1	1
IPSS Intermediärrisiko 2	2

IPSS Hochrisiko	3
Transfusionsbedarf für Erythrozyten	1
Thrombozyten <100G/l	1
Ungünstiger Karyotyp (ungünstiger Karyotyp ist definiert als komplexer Karyotyp alleine oder Aberrationen wie +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- oder 11q23-Rearrangement)	1

Tabelle 28: Prognostische Einteilung des DIPPS-plus Scores nach Grießhammer et al. (69)

<b>Prognosegruppe</b>	<b>Anzahl von Punkten</b>	<b>Mediane Überlebenszeit</b>
Niedrigrisiko	0	Ca. 15,4 Jahre
Intermediärrisiko 1	1-2	Ca. 6,5 Jahre
Intermediärrisiko 2	3-4	Ca. 2,9 Jahre
Hochrisiko	5-6	Ca. 1,3 Jahre

## 9 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer ... für das interessante Thema und dem Ermöglichen der Umsetzung dieser Dissertation. Vielen Dank für den beständigen Austausch, die unkomplizierte Art und der Weise der Kommunikation und die geduldige Bereitschaft als fachlich kompetenter Ansprechpartner für mich erreichbar zu sein.

Ein weiterer Dank gilt der ... in der Immunologie, sowie dem Team der III. Medizinischen Klinik, insbesondere in der Durchflusszytometrie und der hämatologischen Ambulanz für die geduldige Beantwortung meiner Fragen und die vielen Hinweise und Hilfestellungen, die das Zustandekommen dieser Arbeit um ein Vielfaches erleichtert haben. Danke auch an ..., vor allem für die konstante Motivation und das spontane Beantworten jeder noch so abwegigen Frage.

Vielen herzlichen Dank für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und die unkomplizierte Hilfe beim Sammeln aller notwendigen Daten an Frau ... in Mainz und Herr ... in Frankfurt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die uneingeschränkte, vielseitige Hilfsbereitschaft und jegliche Art von Unterstützung, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben von ganzem Herzen danken.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf