

**Lysin-spezifische Demethylase 1 in hämatopoetischen und
lymphatischen Neoplasien**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Dennis Niebel

aus Köln

2016

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. I. Gütgemann
2. Gutachter: Apl.-Prof. A. Eis-Hübinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.02.2016

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Kristiansen

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1. Einleitung | 9 |
| 1.1 Epigenetik | 9 |
| 1.1.1 Das Chromatin und das Nukleosom..... | 9 |
| 1.1.2 Epigenetische Veränderungen | 12 |
| 1.1.2.1 DNA Methylierung | 12 |
| 1.1.2.2 Nichtkodierende RNA..... | 12 |
| 1.1.2.3 Histonmodifikation..... | 13 |
| 1.1.2 Histondemethylasen und LSD1 | 15 |
| 1.1.2.1 LSD1: Biochemie | 15 |
| 1.1.2.2 LSD1: Physiologische Funktion..... | 19 |
| 1.1.2.3 LSD1: Karzinogenese | 20 |
| 1.1.2.4 LSD1: AML..... | 22 |
| 1.2 Therapieoptionen in hämatologischen Neoplasien..... | 24 |
| 1.2.1 Konventionelle Therapie..... | 24 |
| 1.2.2 Zielgerichtete Therapie („Targeted Therapies“)..... | 25 |
| 1.2.3 Therapieoptionen mit epigenetischen Zielstrukturen | 25 |
| 1.2.4 LSD1-Inhibitoren als Therapieoption | 28 |
| 1.3 Fragestellung der Arbeit | 30 |
| 1.4 WHO Klassifizierung hämatologischer Neoplasien | 31 |
| 1.4.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN) | 32 |
| 1.4.1.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML)..... | 32 |
| 1.4.1.2 Polyzythämia Vera (PV) | 33 |
| 1.4.1.3 Primäre Myelofibrose (PMF) | 34 |
| 1.4.1.4 Essentielle Thrombozythämie (ET) | 35 |
| 1.4.2 Myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Aberration von PDGFRA, PDGFRB und FGFR1 | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.4.3 | Myelodysplastische / myeloproliferative Neoplasien | 36 |
| 1.4.4 | Myelodysplastische Syndrome (MDS)..... | 37 |
| 1.4.5 | Akute myeloische Leukämien (AML)..... | 39 |
| 1.4.6 | Akute Leukämien unklarer Zelllinie | 41 |
| 1.4.7 | Lymphatische Vorläuferzell-Neoplasien | 42 |
| 1.4.8 | Reife B-Zell-Neoplasien | 43 |
| 1.4.8.1 | Niedrigmaligne B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) | 44 |
| 1.4.8.2 | Hochmaligne B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) | 48 |
| 1.4.9 | Reife T-Zell-/NK-Zell-Lymphome..... | 49 |
| 1.4.9.1 | Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AITL)..... | 49 |
| 1.4.9.2 | Anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL)..... | 50 |
| 1.4.9.3 | Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (PTCL, NOS)..... | 50 |
| 1.4.10 | Hodgkin Lymphom | 51 |
| 2. | Methoden | 53 |
| 2.1 | Studienkollektiv | 53 |
| 2.1.1 | Knochenmarkstanzbiopsien | 53 |
| 2.1.2 | Lymphatisches Gewebe | 56 |
| 2.2 | Diagnosestellung..... | 59 |
| 2.2.1 | Patho Pro [®] | 60 |
| 2.2.2 | ORBIS [®] | 60 |
| 2.2.3 | Knochenmarkzytomorphologie..... | 61 |
| 2.2.4 | Knochenmarkhistologie | 62 |
| 2.2.5 | Durchflusszytometrie..... | 64 |
| 2.2.6 | Molekularpathologische Verfahren..... | 65 |
| 2.2.6.1 | Zytogenetische Verfahren | 66 |
| 2.2.6.2 | Molekulargenetische Verfahren..... | 67 |
| 2.3 | Tissue Micro Array Analyse..... | 67 |
| 2.4 | LSD1-Immunhistochemie | 68 |
| 2.5 | Scoring | 68 |
| 2.6 | Grafische Darstellung..... | 69 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.7 | Statistische Auswertung | 70 |
| 2.8 | Textbearbeitung | 70 |
| 3. | Ergebnisse | 71 |
| 3.1 | Knochenmarkstanzbiopsien | 71 |
| 3.2 | Lymphatische Gewebe | 76 |
| 4. | Diskussion | 80 |
| 4.1 | Therapeutische Relevanz | 82 |
| 4.2 | Differentialdiagnostische Relevanz | 85 |
| 4.3 | Ausblick | 86 |
| 5. | Zusammenfassung | 87 |
| 6. | Anhang | 89 |
| 7. | Abbildungsverzeichnis | 90 |
| 8. | Tabellenverzeichnis | 91 |
| 9. | Literaturverzeichnis | 92 |
| 10. | Danksagung | 111 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| AITL | Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom |
| ALCL | Anaplastisch großzelliges Lymphom |
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| APL | Akute Promyelozytenleukämie |
| AR | Androgenrezeptor |
| B-NHL | B-Zell Non-Hodgkin Lymphom |
| CD | Cluster of Differentiation (Zelloberflächenmarker) |
| CEBPA | CCAAT/enhancer-binding Protein Alpha |
| CLL | Chronisch lymphatische Leukämie |
| CML | Chronisch myeloische Leukämie |
| CMML | Chronisch myelomonozytäre Leukämie |
| CoREST | RE1-silencing transcription factor corepressor 1 |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanin |
| DLBL | Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EPO | Erythropoetin |
| ET | Essentielle Thrombozythämie |
| FAB | French-American-British Klassifikation akuter Leukämien |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FGFR | Fibroblast growth factor receptor |
| FLT3-ITD | Fms-like Tyrosinkinase 3 internal Tandemduplikation |
| G-CSF | Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor |
| Gfi1 | Growth factor independent 1 transcription repressor |
| H3K4 | Lysin 4 des Histon 3 |
| H3K9 | Lysin 9 des Histon 3 |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |

| | |
|--------------|--|
| Her2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| HL | Hodgkin Lymphom |
| ICD-O-3 | International Classification of Disease for Oncology, dritte Edition |
| KDM1A | Lysin-spezifische Demethylase 1 |
| LSD1 | Lysin-spezifische Demethylase 1 |
| mAB | monoklonaler Antikörper |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MAOi | Monoaminoxidase Inhibitor |
| MDS | Myelodysplastisches Syndrom |
| MLL1 | Lysin-spezifische-Methyltransferase 2A |
| MLL1-Gen | Mixed-lineage leukemia Gen, kodiert für MLL1 |
| MPN | Myeloproliferative Neoplasie |
| MPO | Myeloperoxidase |
| NHL | Non-Hodgkin Lymphom |
| NK-Zelle | Natürliche Killerzellen |
| NPM1 | Nucleophosmin 1 Gen |
| NuRD | Nucleosome remodeling deacetylase |
| PAS-Reaktion | Periodic acid-Schiff Reaktion |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGFR | Plateled-derived growth factor receptor |
| PMF | Primäre Myelofibrose |
| PTCL | Peripheres T-Zell Lymphom |
| PV | Polycythaemia Vera |
| RA | Refraktorische Anämie |
| RAEB I | Refraktorische Anämie mit Blastenüberschuss, Stadium 1 |
| RAEB II | Refraktorische Anämie mit Blastenüberschuss, Stadium 2 |
| RARS | Refraktorische Anämie mit Ringsideroblasten |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| TdT | Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase |
| TMA | Tissue micro array |
| TNM-Stadium | Tumor-Nodes-Metastasis-Stadium |

| | |
|---------|--|
| T-NHL | T-Zell Non-Hodgkin Lymphom |
| TP53BP1 | Tumorsuppressor Protein 53-bindendes Protein 1 |
| WHO | World-Health-Organization |

1. Einleitung

1.1 Epigenetik

Die DNA enthält in ihrer Abfolge an komplementären Basenpaaren die Erbinformationen des Menschen in Form von mehreren tausend Genen (Pearson, 2006). Die Lehre über Gene und die Vererbung sowie Variation von genetischen Merkmalen in lebenden Organismen bezeichnet man als Genetik. Ein Gen wird dabei im klassischen Sinne als ein Teilbereich der DNA angesehen, der die Information für eine bestimmte zelluläre Funktion beinhaltet, diese also kodiert (Pearson, 2006; Rassow et al., 2008).

Epigenetik ist demgegenüber definiert als erbliche Veränderungen der Genexpression, die nicht auf Änderungen in der DNA Sequenz selbst beruhen, und bei Zellteilungen beibehalten werden; somit stellt sie eine Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp her (Goldberg et al., 2007). Sie ist eine mögliche Erklärung dafür, dass, obwohl alle Zellen im Organismus die gleiche genetische Ausstattung besitzen, Differenzierung in unterschiedlich spezialisierte Gewebe stattfindet (Arrowsmith et al., 2012).

Anfangs sollen hier die Grundlagen der Epigenetik dargestellt werden.

1.1.1 Das Chromatin und das Nukleosom

Die DNA, welche die genetische Information der Zelle beinhaltet, liegt im Zellkern der eukaryonten Zelle mit Proteinen assoziiert in kondensierter Form vor; diese Struktur bezeichnet man als Chromatin. Dabei ist das Chromatin im Normalfall auf 46 einzelne Chromosomen aufgeteilt, von denen 22 homologe Chromosomenpaare gleicher genetischer Ausstattung vorliegen (Autosomen). Des Weiteren finden sich in der Zelle zwei Geschlechtschromosomen: beim Mann jeweils ein X- und Y-Chromosom, bei der Frau dagegen zwei X-Chromosomen (Rassow et al., 2008). Die Gesamtzahl der Chromosomen einer menschlichen Zelle bezeichnet man als Karyotyp, der im Normalfall abhängig vom Geschlecht mit 46, XX oder 46, XY beschrieben wird.

Stellen, an denen das Chromatin besonders dicht gepackt ist, bezeichnet man als Heterochromatin, welches hauptsächlich aus nicht-kodierenden, repetitiven Sequenzen

besteht (Lim, 2009). Heterochromatin kann als konstitutive Form stets kondensiert vorliegen, oder als fakultative Form, bei der unter bestimmten Umständen eine Dekondensation erfolgt (Oberdoerffer und Sinclair, 2007). Es ist von großer Bedeutung für die Stabilität der Chromosomen und die Verhinderung von Mutationen und Translokationen (Muegge, 2005). Heterochromatin lässt sich lichtmikroskopisch darstellen, da der hohe Gehalt an assoziierten nukleären Proteinen eine gute Anfärbbarkeit bedingt (Virani et al., 2012). Als Euchromatin bezeichnet man dagegen Bereiche der DNA, die weitaus weniger dicht kondensiert sind und somit den Zugang des Transkriptionsapparats der Zelle ermöglichen. Deshalb wird Euchromatin als der Bereich des Chromatins angesehen, auf dem Gene abgelesen werden können (Arrowsmith et al., 2012). Dabei nimmt es allerdings nur einen geringen Anteil des Gesamtchromatins ein (Lim, 2009). Der Zustand des Chromatins ist auch abhängig vom Zellzyklus; so ist der oben beschriebene Chromatinzustand bestehend aus Hetero- und Euchromatin während der Interphase vorzufinden. In der Metaphase des Zellzyklus ist dagegen das gesamte Chromatin besonders dicht gepackt (Rassow et al., 2008).

Als Untereinheit des Chromatins liegt das Element des Nukleosoms vor, das sich aus der DNA selbst und Histonproteinen zusammensetzt. Es gibt fünf Klassen von Histonen (H1, H2A, H2B, H3, H4), von denen sich die Kern-Histone zum typischen Histon-Oktamer zusammensetzen, um welches die DNA in der Länge von etwa 146 Basenpaaren aufgewickelt ist (Varier und Timmers, 2011). Dabei besteht ein Oktamer jeweils aus zwei H2A, zwei H2B, zwei H3 und zwei H4 Histonproteinen; das H1 Protein ist dagegen an der Verbindung mehrerer Oktamere beteiligt (Luger et al., 1997). N-terminale Aminosäurereste der Histone ragen aus dem Nukleosom heraus und sind Angriffspunkt für posttranslationale Modifikationen. Viele Nukleosomen reihen sich wie „Perlen auf einer Schnur“ aneinander und bilden somit das Rückgrat der DNA Organisation (Virani et al., 2012), siehe Abbildung 1.

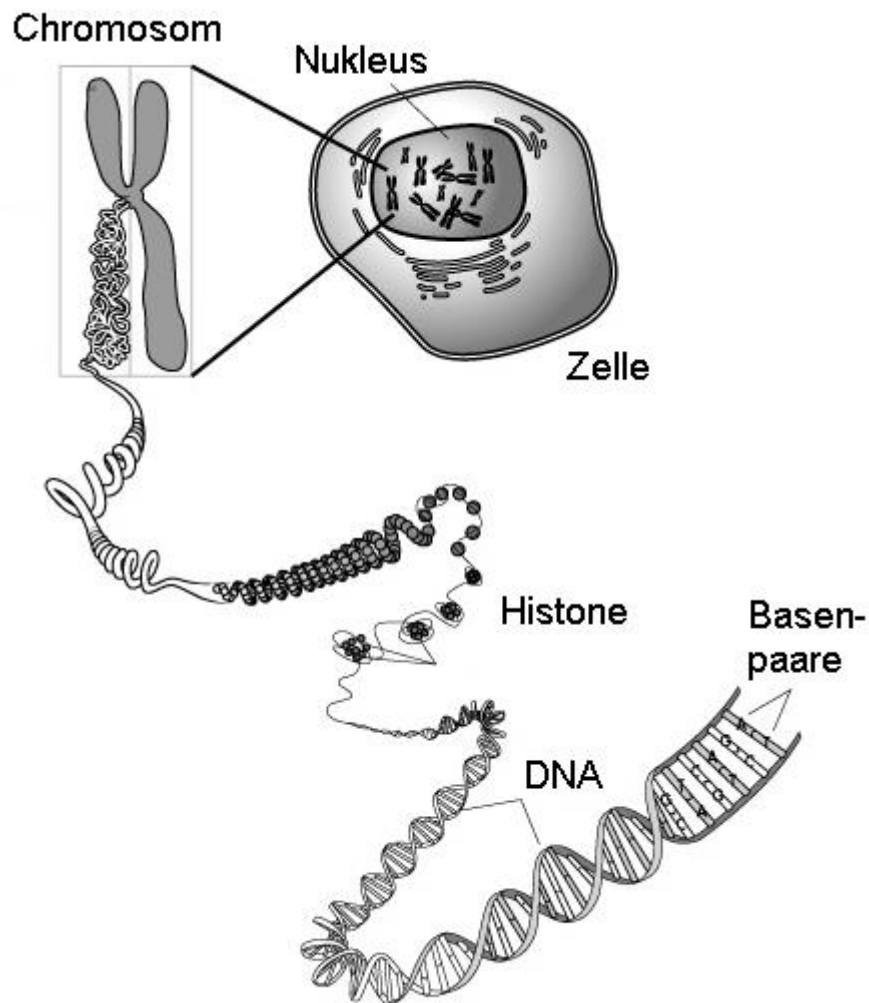


Abb. 1: Chromatinstruktur in der eukaryonten Zelle

Die Histone bilden eine zentrale Untereinheit der Chromatinstruktur, da sich die doppelsträngige DNA um sie windet. Gemeinsam nehmen sie die übergeordnete Struktur einer Perlenkette an. Diese Kette verdrillt sich ihrerseits zu größeren Struktureinheiten und schließlich zu den Chromosomen, die im Zellkern der Zelle vorliegen. (Abbildung vereinfacht nach: National Human Genome Research Institute (NHGRI), <http://www.genome.gov> (Zugriffsdatum 28.10.2014).

Auf der Ebene des Nucleosoms gibt es eine ganze Reihe von Modifikationen, sowohl an der DNA selbst, als auch an den umgebenden Proteinen, die für unterschiedliche Genexpressivität verantwortlich gemacht werden konnten (Lim, 2009). Folglich gilt das Nucleosom als zentrale Schaltstelle der epigenetischen Regulation (Virani et al., 2012). Diese wird wiederum als maßgeblich für zelluläre Differenzierung betrachtet (Goldberg

et al., 2007). Nun folgt ein kurzer Überblick über mögliche epigenetische Vorgänge, bevor die Rolle der Lysin-spezifischen Demethylase detailliert erörtert wird.

1.1.2 Epigenetische Veränderungen

1.1.2.1 DNA Methylierung

Die spezifische Methylierung von Cytosinbasen in sogenannten Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotiden innerhalb der Basenabfolge der DNA war die erste bekannte epigenetische Veränderung (Lim, 2009). Diese Dinukleotide kommen gehäuft in sogenannten CpG-Bereichen oder auch „CpG-Inseln“ vor, innerhalb derer mehr als die Hälfte der Basen in einer Ausdehnung von mindestens 200 Basenpaaren aus Cytosin und Guanosin bestehen (Illingworth und Bird, 2009). CpG-Inseln sind ein wiederkehrendes Merkmal innerhalb von Promotorelementen der DNA; dabei geht ein ausgeprägter Status an CpG-Methylierung mit Genabschaltung einher (Feinberg und Tycko, 2004). Des Weiteren wird eine starke Ausprägung an DNA-Methylierung außerhalb dieser CpG-Inseln mit Heterochromatin in Verbindung gebracht; ein hoher Gesamtanteil an methylierter DNA wirkt somit repressorisch auf Transkription (Jones und Baylin, 2007). Dies wurde unter anderem dadurch gezeigt, dass methylierte DNA sich besonders in hochkonservierten Bereichen wie den Zentromeren befindet und dass es an Vorgängen wie X-Chromosom Inaktivierung und genomischem Imprinting beteiligt ist (Feinberg und Tycko, 2004; Goldberg et al., 2007). Bei dem Vorgang der DNA-Methylierung sind verschiedene Enzyme, namentlich DNA-Methyltransferasen (DNMTs) beteiligt. Wenn global gesehen die DNA-Methylierung in zu geringem Maße vorliegt, führt dies zu genomischer Instabilität (Goldberg et al., 2007).

1.1.2.2 Nichtkodierende RNA

Die Wechselwirkungen bestimmter RNA-Moleküle, sowohl mit dem Chromatin als auch mit DNMTs und Histon-modifizierenden Enzymen, sind ebenfalls als epigenetische Mechanismen etabliert, da über komplexe Interaktionen eine stabile Genabschaltung

bewirkt werden kann (Goldberg et al., 2007). Diese Vorgänge sind im Rahmen dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung, gleichwohl wichtige epigenetische Vorgänge.

1.1.2.3 Histonmodifikation

Distinkte posttranslationale Modifikationen an Histonresten stellen für die Zelle durch veränderte Chromatinstruktur ein regulatorisches Muster für Genexpression dar (Dent und Chandra, 2013). In diesem Zusammenhang spricht man auch vom „Histon Code“ (Jenuwein und Allis, 2001). Bekannte posttranslationale Modifikationen umfassen dabei die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung von Histonresten (Berger, 2007).

Während Histonacetylierung und Histonphosphorylierung durch Änderung der elektrischen Ladungsverhältnisse mit direkter Beeinflussung der Chromatinstruktur und folgender Genaktivierung assoziiert werden (Feinberg und Tycko, 2004; Goldberg et al., 2007), ist der Effekt des Histonmethylierungsstatus abhängig von der Position und der Ausprägung der Methylierung (Mono-, Di- oder Trimethylierung) am jeweiligen Histon (Ruthenburg et al., 2007). Der Vorgang der Methylierung bewirkt keine Änderung der elektrischen Ladung, somit ist der Effekt auf die Chromatinstruktur eher in einer veränderten Interaktion mit anderen beteiligten Strukturen zu sehen, also als indirekter Mechanismus (Arrowsmith et al., 2012). Beispielsweise bewirkt eine Trimethylierung von Lysin 4 des Histons 3 (H3K4) eine Aktivierung der Transkription; dagegen bewirkt die Trimethylierung von Lysin 27 des Histons 3 (H3K27) eher die Repression der assoziierten Genregionen (Dawson und Kouzarides, 2012). Somit stellt der Methylierungsstatus an bestimmten Histonresten jeweils ein spezifisches epigenetisches Merkmal dar (Margueron et al., 2005). Seit einigen Jahren steht fest, dass nicht nur Histonacetylierung sondern auch -methylierung ein reversibler Vorgang ist und dieser Status durch verschiedene Enzyme beeinflusst wird. Zum Beispiel bewirken Histonmethyltransferasen eine Zunahme der Methylierung an bestimmten Histonresten. Demethylasen bewirken das Gegenteil und sind demnach als ihre Antagonisten anzusehen (Black und Whetstone, 2013, Shi et al., 2004).

Das gesteigerte Interesse an epigenetischen Vorgängen sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Zuständen in der Zelle hat zur Identifizierung ganzer Familien an beteiligten Enzymen geführt, die im Weiteren nicht detailliert beschrieben werden können. Tabelle 1 ermöglicht einen groben Überblick über die bekannten beteiligten Enzymklassen.

Tab. 1: Epigenetische Modifikationen und beteiligte Enzymfamilien

Die verschiedenen Mechanismen epigenetischer Regulation werden meist durch antagonistisch wirkende Enzymklassen reguliert. Die Effekte auf den Chromatinzustand und die Transkription unterscheiden sich je nach Modifikation und nach Substrat, z.B. abhängig davon, welche Aminosäure an welcher Stelle eines Histons wie modifiziert wird. Tabelle stark vereinfacht nach (Arrowsmith et al. 2012; Lim, 2009).

| | |
|------------------------------|---|
| DNA Methylierung | DNA-Methyltransferasen (DNMTs) |
| Histonmodifizierungen | |
| <i>Lysinmethylierung</i> | Lysin-Methyltransferasen Lysin-Demethylasen (z.B. LSD1) |
| <i>Argininmethylierung</i> | Arginin-Methyltransferasen Arginin-Demethylasen |
| <i>Phosphorylierung</i> | Ser / Thr-Kinasen Phosphatasen |
| <i>Acetylierung</i> | Histon-Acetyltransferasen (HATs) Histon-Deacetylasen (HDACs) |
| <i>Ubiquitinilierung</i> | Ubiquitin Ligasen |

Das Wissen über die verschiedenen beteiligten Proteine und die assoziierten Histonreste ist in den vergangenen Jahren rasant gewachsen. Hier soll vor allem die Stellung der LSD1 innerhalb dieser komplexen Zellmaschinerie dargestellt werden.

1.1.2 Histondemethylasen und LSD1

1.1.2.1 LSD1: Biochemie

Erstmals konnte 2004 ein Enzym identifiziert werden, welches den Histonmethylierungsstatus im Komplex mit anderen beteiligten Faktoren beeinflusst. Dieses wurde aufgrund seiner Substratspezifität für Lysinreste „Lysin-spezifische Demethylase 1“ (LSD1) genannt (auch als KDM1A oder AOF2 bezeichnet) und beendete die bis dahin gültige Lehrmeinung, dass Histonmethylierung ein erblicher und unveränderlicher Zustand sei (Shi et al., 2004).

LSD1 zeigt dabei eine starke Präferenz für die Demethylierung von mono- und dimethylierten Lysinresten und katalysiert einen FAD-abhängigen Vorgang (Culhane et al., 2006; Forneris et al., 2005). Bei der Reaktion entsteht unter anderem transient Wasserstoffperoxid, das eine oxidierende Wirkung auf die DNA aufweist (Amente et al., 2010a). Trimethylierte Lysinreste kann es im Gegensatz zu später entdeckten Histondemethylasen der Jumonji-Familie, die Eisen(II) oder α -Ketoglutarat als Kofaktoren benötigen, nicht demethylieren (Fathi und Abdel-Wahab 2012; Forneris et al., 2005, Mosammaparast und Shi, 2010), siehe Abbildung 2.

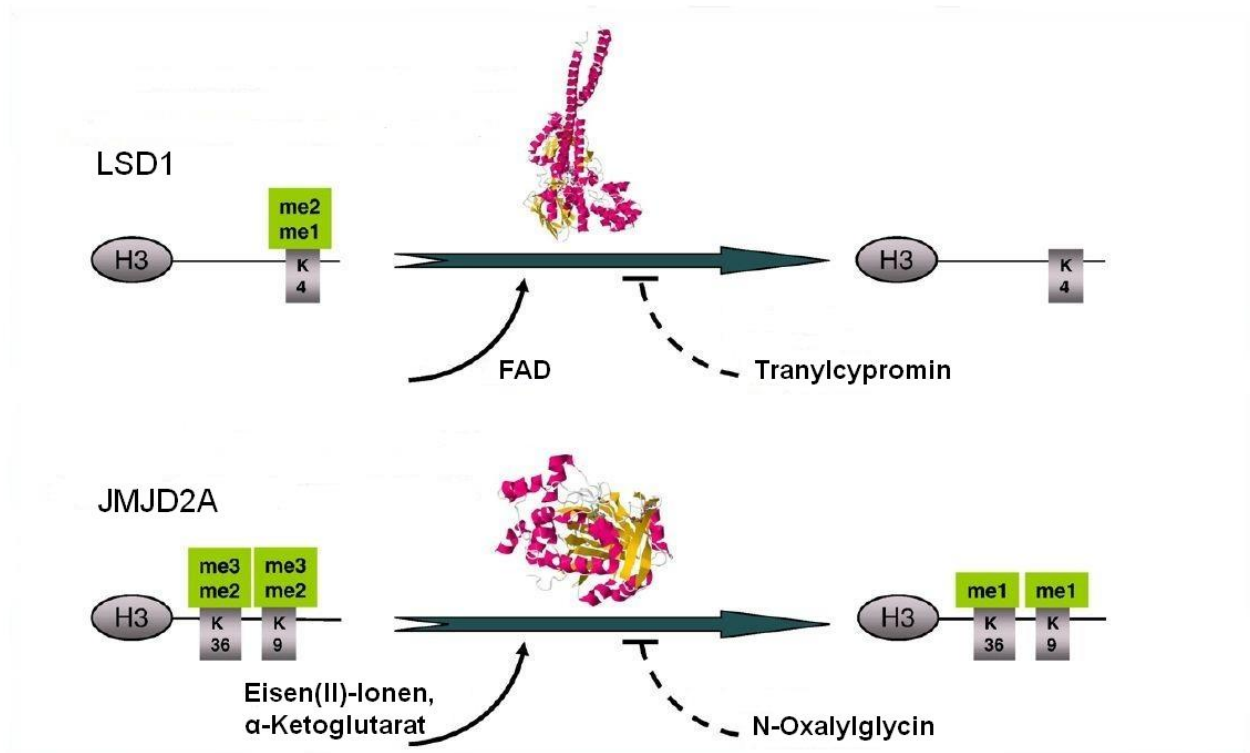


Abb. 2: Reaktionsmechanismen verschiedener Lysindemethylasen

Aminooxidase-Typ Demethylasen wie z.B. LSD1 (oben) demethylieren mono- und dimethyliertes Lysin 4 des Histons 3 in einem FAD-abhängigen Reaktionsschritt. Oxygenase-Typ Demethylasen wie z.B. JMJD2A (unten) benötigen dagegen Kofaktoren wie Eisen(II)-Ionen oder α -Ketoglutarat, können dafür Trimethylreste demethylieren. Auch die Jumonji-Proteinfamilie hat jeweils sehr spezifische Substrate, im Falle des Enzyms JMJD2A das Lysin 9 und Lysin 36 des Histons 3. Verschiedene Stoffe können die Reaktionen inhibieren, z.B. ist Tranylcypromin ein potenter Inhibitor von LSD1. Abbildung überarbeitet aus: (Varier und Timmers, 2011).

Die Struktur des Proteins gliedert sich in drei Hauptdomänen, von denen die katalytische Domäne eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit Monoaminoxidasen (MAOs) aufweist (Lim, 2009). Es konnte im Folgenden gezeigt werden, dass konventionelle unspezifische MAO-Inhibitoren (MAOi) die katalytische Aktivität effizient hemmen (Lee et al., 2006). Die anderen Domänen scheinen einerseits für die Chromatinbindung und andererseits für die Bindung verschiedener Kofaktoren verantwortlich zu sein (Anand und Marmorstein, 2007).

Da der Effekt des Methylierungsstatus auf die Transkriptionsaktivität von dem Lysinrest des Histons abhängt, ist es wichtig zu erwähnen, dass LSD1 in unterschiedlichen Komplexen sein Substrat zu ändern vermag. Somit kommt ein repressiver Effekt auf

Genexpression durch Demethylierung von Mono- und Dimethylresten an H3K4 im Komplex mit anderen Faktoren, wie CoREST oder NuRD, zum Tragen. Unter Anwesenheit hormoneller Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem Androgenrezeptor (AR) wechselt das Substrat dagegen zu H3K9, sodass eine transkriptionische Aktivierung bewirkt wird (Forneris et al., 2007; Metzger et al., 2005), siehe Abbildung 3. Es wurde gezeigt, dass dieser komplexe Wechsel der Substratspezifität seinerseits ebenfalls über eine Histonmodifikation veranlasst wird und zwar mittels einer Phosphorylierung am Threonin 6 des Histons 3, welche durch die Proteinkinase C (PKC) beta veranlasst wird (Metzger et al., 2010).

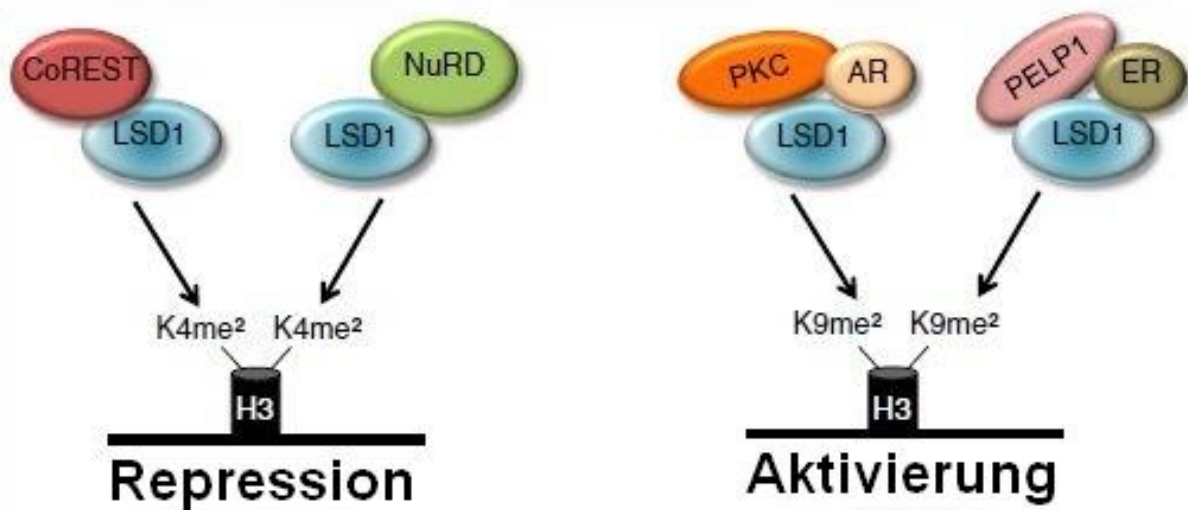


Abb. 3: LSD1 Substratspezifität

Die Substratspezifität von LSD1 ändert sich in Abhängigkeit von anwesenden Kofaktoren wie CoREST, NuRD oder Hormonrezeptoren wie dem Androgenrezeptor (AR) oder Östrogenrezeptor (ER) zwischen Lysin 4 und Lysin 9 des Histons 3, was gegenteilige Effekte auf die Gentranskription bewirkt: Repression oder Aktivierung. Dies erklärt teilweise die komplexen Effekte von LSD1 je nach zellulärem Kontext. Abkürzungen: CoREST: RE1-Silencing transcription factor Corepressor 1; NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase; K4me²: dimethyliertes Lysin 4; H3: Histon 3; PKC: Proteinkinase C; AR: Androgenrezeptor; PELP1: Proline, glutamic acid, leucinerich protein 1; ER: Östrogenrezeptor; K9me²: dimethyliertes Lysin 9. Abbildung aus: (Amente et al., 2013).

Des Weiteren beeinflussen auch andere Histonmodifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung die Aktivität von LSD1, sodass die epigenetische Regulierung als äußerst komplexer Vorgang angesehen werden muss (Cohen et al., 2011). Es wurde

gezeigt, dass LSD1 erst nach Beseitigung von Acetylgruppen effektiv eine Demethylierung vornehmen kann. Demnach agiert LSD1 im Komplex mit HDACs in einem geregelten Zusammenspiel (Forneris et al., 2006). Dies ist auch für viele weitere Histon-modifizierende Enzymfamilien der Fall (Arrowsmith et al., 2012). Verschiedene Histon Modifikationen sind also nicht als isolierte Vorgänge zu betrachten, sondern eher als ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen beteiligten Enzymfamilien (Varier und Timmers, 2011).

Interessanterweise beschränkt sich die biochemische Aktivität von LSD1 jedoch nicht exklusiv auf die Histon Demethylierung. Viel eher kommt es gleichfalls zu posttranslationalen kovalenten Modifikationen an „Nicht-Histon-Proteinen“. Ein besonders erwähnenswertes Substrat stellt hierbei das p53, der sogenannte „Wächter des Genoms“, dar (Lane, 1992). Die LSD1 vermittelte spezifische Demethylierung des dimethylierten Lysin 370 von p53 führt zu einer verringerten Interaktion mit dem Koaktivator TP53BP1, was schließlich zu einer Verminderung der antiapoptotischen Wirkung des p53 führt (Huang et al., 2007; Scoumanne und Chen, 2008).

Darüber hinaus besteht eine Interaktion mit DNMT1, wodurch der globale DNA-Methylierungsstatus beeinflusst wird und die epigenetische Regulation auch abseits des „Histon Codes“ beeinflusst wird (Amente et al., 2013). Hier scheint die Wirkung darin zu bestehen, die DNMT1 zu stabilisieren und so den globalen DNA-Methylierungsstatus zu erhöhen und folglich eine repressorische Wirkung auf die Transkription zu vermitteln (Wang et al., 2009). Es ist erwähnenswert, dass auch andere Histon-modifizierende Proteine mit DNA-Methyltransferasen interagieren. Somit bestehen Überschneidungen zwischen verschiedenen epigenetischen Mechanismen, welche in der Literatur als „Crosstalk“ bezeichnet werden. (Varier und Timmers, 2011).

Trotz der Vielzahl an beteiligten Enzymfamilien und dem komplexen Zusammenspiel zwischen diesen wird LSD1 aufgrund seiner Wirkungen auf Histon und Nicht-Histon Proteine eine zentrale Stellung in der epigenetischen Regulation der Zelldifferenzierung zugeschrieben (Nicholson und Chen, 2009).

1.1.2.2 LSD1: Physiologische Funktion

Es konnte gezeigt werden, dass LSD1 an der Regulation einer Reihe von biologischen Vorgängen beteiligt ist. Durch die spezifische Beeinflussung des Histonmethylierungsstatus an Promotern und Enhancern von Genen, die Entwicklung und Differenzierung bewirken, ist es an der Beibehaltung von Pluripotenz in embryonalen Stammzellen beteiligt (Adamo et al., 2011). Dies scheint neben Demethylierungen unter anderem durch Interaktion mit HDAC1 und Beeinflussung des Acetylierungsstatus des Lysin 16 des Histons 4 bewirkt zu werden (Yin et al., 2014). Seine Funktion bezüglich zellulärer Differenzierung ist für Gewebe verschiedenster Art bedeutsam, so zum Beispiel auch für neuronale Stammzellen (Sun et al., 2010). Eine universelle Rolle in der Embryonalentwicklung konnte dadurch demonstriert werden, dass konstitutiver Knockout von LSD1 in Mäuseembryonen nach einigen Tagen letal ist (Wang et al., 2007).

Eine Relevanz wird des Weiteren für Vorgänge wie Adipogenese, Spermatogenese und Chromosomensegregation angenommen (Chen et al., 2012). Auch an anderen elementaren biologischen Vorgängen wie der Meiose ist eine Beteiligung beschrieben worden (Godmann et al., 2007; Lim, 2009).

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass LSD1 in der frühen Hämatopoese maßgeblich zur zellulären Differenzierung beiträgt (Hu et al., 2009). Dies scheint u.a. über eine Interaktion des LSD-1-CoREST-HDAC1 Komplexes mit den transkriptionellen Repressoren Gfi-1 und Gfi-1b erreicht zu werden. Hier zeigte sich durch Herunterregulierung von LSD1 eine gestörte Differenzierung der verschiedenen Zellreihen und der erythroiden Progenitorzellen (Saleque et al., 2007). Eine spätere Studie bestätigt dies und zeigt, dass LSD1 Knockdown auch in späteren Stadien der Blutzellreifung zu einer verringerten Anzahl peripherer Blutzellen führt, die allerdings reversibel ist (Sprussel et al., 2012). LSD1 hat also nicht nur in embryonalen Stammzellen, sondern auch in hämatopoetischen Stammzellen eine zentrale Bedeutung. In diesen wurde LSD1 als epigenetischer Wächter der Selbsterneuerungskapazität und der Homöostase und somit als unverzichtbar für regelrechte frühe und späte Hämatopoese beschrieben (Kerenyi et al., 2013).

Abseits davon konnte gezeigt werden, dass LSD1 synergistisch mit HDAC1 eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen unterdrückt (Janzer et al., 2012). Eine andere Studiengruppe konnte darlegen, dass eine spezifische Rekrutierung im Rahmen der Antwort auf DNA Schäden auftritt, der sogenannten DNA-Damage-Response. Unter LSD1 Knockdown zeigte sich demnach eine erhöhte Strahlenanfälligkeit der DNA (Mosammaparast et al., 2013).

Zusammenfassend kann also angenommen werden, dass die epigenetische Regulation, an der LSD1 maßgeblich beteiligt ist, über die Beibehaltung des Stammzellstatus oder die terminale Differenzierung mit entscheidet. Des Weiteren ist LSD1 an einer Vielzahl von elementaren Vorgängen in der Zelle beteiligt und es ist davon auszugehen, dass weitere bisher unentdeckte Funktionen vorliegen könnten.

1.1.2.3 LSD1: Karzinogenese

LSD1 ist genau wie andere epigenetische Regulatoren abseits seiner zuvor beschriebenen zentralen physiologischen Rollen in den Fokus bezüglich möglicher onkogener Wirkungen gerückt (Fathi und Abdel-Wahab, 2011). Neben dem globalen Methylierungslevel der DNA scheint auch die Balance an Histonmodifikationen selbst einen Einfluss auf die genomische Integrität auszuüben, die in der Karzinogenese von großer Bedeutsamkeit ist (Black und Whetstone, 2013). Somit erwecken LSD1 gemeinsam mit anderen Histonmethylasen und -demethylasen das Interesse der Krebsforschung. Neben diesem Aspekt gibt es verschiedene konkrete Hinweise, die auf eine LSD1 Beteiligung an der malignen Entartung von Zellen deuten, von denen hier einige erläutert werden sollen.

Wie bereits erwähnt interagiert LSD1 mit p53 und versetzt die Zelle in einen anti-apoptotischen Zustand (Huang et al., 2007). Da p53 als wichtiges Tumorsuppressorgen in einer Vielzahl von Tumoren in seiner Funktion beeinträchtigt ist (Hollstein et al., 1991), stellt die LSD1 bedingte Dysfunktion dieses Proteins eine mögliche Tumor fördernde Eigenschaft dar.

Darüber hinaus wird für alle epigenetischen Regulatoren angenommen, dass sie über zwei Mechanismen Krankheiten und auch Krebs erzeugen können. Einerseits ist durch aberrante Überaktivierung oder Überexpression denkbar, dass direkt assoziierte zelluläre Genexpressionmuster verändert abgelesen werden. Andererseits ist es durch das komplexe Zusammenspiel assoziierter zellulärer Proteine, z.B. DNA-bindender Transkriptionsfaktoren, möglich, dass bestimmte Gene durch veränderte Interaktion mit deren regulierenden Einheiten herauf- oder herunter reguliert werden. Dies entspricht einer indirekten Veränderung der Genexpression (Arrowsmith et al., 2012). Das soll anhand einiger Beispiele konkret für LSD1 demonstriert werden:

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Myc, ein Protoonkogen, LSD1 im Komplex mit weiteren Faktoren rekrutiert und für seinen transkriptionalen Effekt benötigt (Amente et al., 2010a). Myc hat eine Vielzahl von Wirkungen auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose und kann diverse Tumoren auslösen (Amente et al., 2010b). Eine Beteiligung an hämatologischen Neoplasien (z.B. ALL, DLBL) ist ebenfalls beschrieben und wird weiter unten dargestellt. Somit scheint LSD1, wenn auch indirekt, an Myc-vermittelter onkogener Transformation beteiligt zu sein.

Es wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Regulierung des NOTCH-Signalweges gefunden, einer zentralen Schaltstelle der T-Zell Entwicklung, die in vielen Fällen von T-ALL aktivierende Mutationen aufweist (Yatim et al., 2012). Die Funktion des LSD1 wird hier als NOTCH1 Koaktivator angesehen, die über die Demethylaseaktivität an NOTCH-spezifischen Genen zustande kommt. NOTCH ist allerdings auch in anderen malignen Erkrankungen ein wichtiger Faktor, der jedoch abhängig vom zellulären Kontext onkogene oder tumor-suppressive Wirkungen ausüben kann (South et al., 2012). Eine klare Einordnung der LSD1 Funktion fällt also in diesem Zusammenhang aktuell schwer. Anhand konkreter Beispiele gibt es jedoch deutliche Hinweise auf eine onkogene Wirkung einer übermäßigen LSD1-Expression wie im Folgenden erläutert wird:

Eine hohe Ausprägung an LSD1 Expression wird mit Regelmäßigkeit in besonders aggressiven Prostatakarzinomen gefunden und stellt einen negativen prognostischen Faktor dar. Es kann ein kausaler Zusammenhang durch die Aktivierung Androgenrezeptor-vermittelter Genexpression angenommen werden, der über die Demethylierung von H3K9 zustande kommt (Kahl et al., 2006). Des Weiteren wurde beschrieben, dass hohe LSD1 Expression im Prostatakarzinom mit hoher Vascular

endothelial growth factor-A (VEGF-A) Expression korreliert, einem bekannten Indikator für Krankheitsprogress (Kashyap et al., 2013). Angiogenese ist von zentraler Bedeutung für das Wachstum von soliden Tumoren; Hochregulation von proangiogenetischen Faktoren stellt somit ein Malignitätskriterium dar und ähnliche Effekte könnten auch in anderen soliden Tumoren auftreten.

Starke Expression, die sich negativ auf die Prognose auswirkt, wurde auch für andere Tumoren beschrieben, u.a. für hochmaligne Neuroblastome (Schulte et al., 2009), nichtkleinzellige Lungenkarzinome (Lv et al., 2012) und für hepatozelluläre Karzinome (Zhao et al., 2013).

2010 zeigte eine Bonner Arbeitsgruppe, dass hohe LSD1 Expression in her2-negativem Brustkrebs einen Indikator schlechter Prognose darstellt und wies nach, dass LSD1 in Zellkultur ein therapeutisches Angriffsziel darstellt (Lim et al., 2010).

2013 wurde auch eine Hochregulation der Expression von LSD1 in Gewebe von Kolonkarzinomen nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte sich eine Korrelation mit hohen TNM-Stadien und Fernmetastasen, während LSD1 Inhibition Tumorzellwachstum in-vitro hemmte (Ding et al., 2013). Ganz Ähnliches konnte in einer Studie für das Plattenepithel des Ösophagus gezeigt werden (Yu et al., 2013). Eine andere Studie belegte Überexpression in verschiedensten Sarkomen wie zum Beispiel Osteosarkomen und Rhabdomyosarkomen. Hier wurde ebenfalls eine therapeutische Wirkung von LSD1 Inhibitoren in-vitro nachgewiesen (Bennani-Baiti et al., 2012).

Für verschiedenste Tumorzelllinien finden sich vergleichbare Resultate; hier sei beispielhaft das schlecht differenzierte Endometriumkarzinom mit erhöhter LSD1-Expression genannt (Theisen et al., 2014).

Diese und andere Studien zeigen somit deutliche präklinische Hinweise auf einen eventuellen therapeutischen Nutzen von LSD1 Inhibitoren oder sie konstatieren eine prognostische Wertigkeit einer LSD1 Überexpression in den entsprechenden Entitäten.

1.1.2.4 LSD1: AML

Die akute myeloische Leukämie ist eine hämatologische Erkrankung, bei der es zu einer klonalen Expansion von Blasten im Knochenmark des Patienten kommt (siehe auch

Kapitel 1.4.5). Neben den zahlreichen identifizierten genetischen Mutationen, die häufig in diesen Krebszellen nachgewiesen werden können, rücken auch spezifische epigenetische Aberrationen in das Interesse der Forschung.

Da bei dem heutigen Krankheitsverständnis die Existenz sogenannter leukämischer Stammzellen eine zentrale Rolle spielt, ist es wichtig zu erwähnen, dass LSD1 diesbezüglich als wichtiger Regulator identifiziert wurde (Harris et al., 2012). Eine Überexpression an LSD1 wird für einen Differenzierungsblock verantwortlich gemacht, der verhindert, dass die normale hämatopoetische Ausreifung der Zellen stattfinden kann. Gleichzeitig wird eine hohe Expression mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht (Fiskus et al., 2014). Dies wurde vor allem für AML Zelllinien mit Mutation im MLL-Gen gezeigt, könnte aber auch für weitere AML-Formen zutreffen (Schenk et al., 2012).

Die zentrale Bedeutung, die LSD1 bezüglich der AML zukommt, kann besonders anhand der Unterform der akuten Promyelozytenleukämie (APL) demonstriert werden. Patienten, die an APL leiden, verfügen über eine spezifische Translokation $t(15;17)(q22;q21)$, die zu einem Fusionsgen PML/RAR α führt, wodurch ein abnormes Retinolsäure-Rezeptor-Protein entsteht (Herold, 2013a). Schon heute wird bei Patienten mit APL das Medikament all-trans-Retinsäure (ATRA) eingesetzt, weil sich gezeigt hat, dass dieses aufgrund der beschriebenen spezifischen Mutation leukämische Blasten zur Differenzierung führen kann und somit oft eine Heilung möglich ist. In manchen Fällen von APL und in den übrigen AML-Formen sind die Blasten jedoch resistent gegenüber ATRA (Amente et al., 2013). Es ist beschrieben worden, dass der Mechanismus der Entartung in einer verstärkten Deacetylierung von Histon 3 durch das entstandene Fusionsprotein begründet ist, also auf epigenetischen Mechanismen beruht (Fathi und Abdel-Wahab, 2012). Eine Studie zeigte daraufhin, dass eine Kombinationstherapie aus ATRA und Tranylcypromin (ein unspezifischer MAOi, hier als LSD1 Inhibitor) in einem Mausmodell einer humanen AML einen deutlichen anti-leukämischen Effekt aufwies und somit ein positiver Effekt in einer Nicht-APL erreicht werden konnte (Schenk et al., 2012). Dies deutet auf eine mögliche Verwendung von LSD1 Inhibitoren in einer Kombinationstherapie mit ATRA auch bei anderen AML Formen hin. Schon zuvor konnte durch eine andere Arbeitsgruppe an einer APL Zelllinie ein differenzierender Effekt und sogar eine synergistische Aktivität mit Zytostatika durch LSD1 Inhibition

beobachtet werden (Binda et al., 2010). Auch die Reexpression zuvor herunterregulierter Gene in AML Zelllinien nach LSD1 Inhibition wurde als erfolgsversprechend bezüglich zukünftiger AML Therapieoptionen beurteilt, so etwa die erhöhte Expression von CEBPA, die isoliert in AMLs als prognostisch günstig angesehen wird (Fiskus et al., 2014; Murray-Stewart et al., 2014).

Im Abschnitt „LSD1 Biochemie“ wurde beschrieben, dass LSD1 durch komplexe Interaktionen an der Histondeacetylierung mitbeteiligt ist. Da auch HDAC-Inhibitoren als anti-leukämische Medikamente in Betracht gezogen werden, ist es eine aufschlussreiche Beobachtung, dass die Kombination aus HDAC und LSD1-Inhibitoren synergistische Effekte in der Apoptoseinduktion von AML Zelllinien erzielen (Fiskus et al., 2014).

Es ist somit von großem Interesse, die Funktion des LSD1 in entarteten leukämischen Zellen und gerade auch in hämatologischen Stammzellen genauer zu identifizieren, um dessen Rolle in der Pathogenese dieser Krankheit besser zu verstehen.

1.2 Therapieoptionen in hämatologischen Neoplasien

1.2.1 Konventionelle Therapie

In der Behandlung von hämatologischen Neoplasien nehmen vor allem zwei Therapiemodalitäten einen hohen Stellenwert ein: einerseits die zytostatische bzw. zytoreduktive Therapie, teilweise in Kombination mit autologen Stammzelltransplantationen nach Hochdosisregimen, und andererseits allogene Stammzelltransplantationen nach entsprechender Konditionierung. Daneben besitzt auch die Strahlentherapie einen gewissen Stellenwert. Zytostatika lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen, die i.d.R. vor allem schnell teilende Zellen, zu denen viele Tumorzellen gehören, schädigen. Andere Körperzellen, vor allem Wechselgewebe werden dabei ebenfalls geschädigt, somit ergeben sich typische Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Enterokolitis und viele weitere. Ein weiteres Problem ist die mutagene und karzinogene Langzeittoxizität der meisten Zytostatika und assoziierte Zweitneoplasien (Herold, 2013b). Daher sind neue tumorspezifische und nebenwirkungsärmere Wirkmechanismen wünschenswert.

1.2.2 Zielgerichtete Therapie („Targeted Therapies“)

Seit der Entdeckung, dass bestimmte Tumorzellen in ihrem Wachstum abhängig von spezifischen Reizen sind, versucht man, mittels zielgerichteter Moleküle, diese Wachstumsreize auszuschalten. Als Musterbeispiel für eine solche zielgerichtete Therapie oder „Targeted Therapy“ wird oft Imatinib genannt, welches spezifisch die BCR-ABL Tyrosinkinase hemmt, die durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) mit Bildung eines Fusionsgens entsteht. Der Einsatz dieses Medikaments hat zu einer deutlichen Prognoseverbesserung in der CML geführt (Druker et al., 2006; Melo und Barnes, 2007). Ein anderes Beispiel stellen monoklonale Antikörper gegen Zielstrukturen der Tumorzellen dar, so zum Beispiel das Rituximab mit seiner Zielstruktur CD20, das einen festen Stellenwert in der Behandlung von B-NHL einnimmt (Herold, 2013b). Da in der internistischen Tumorthherapie mittlerweile zahlreiche Medikamente über solche spezifischen Angriffspunkte deutliche prognostische Verbesserungen für die Patienten bewirken und die Toxizität durch die relative Selektivität häufig geringer und die Verträglichkeit oftmals besser als die der „klassischen Zytostatika“ ist, ist es eine wichtige Aufgabe der Forschung neue spezifische Angriffsziele zu identifizieren und Inhibitoren derselben zu finden (Herold, 2013b).

1.2.3 Therapieoptionen mit epigenetischen Zielstrukturen

Epigenetische Modifikationen sind an der Herunterregulierung von Tumorsuppressorgenen oder der Aktivierung bzw. Überexpression von Onkogenen beteiligt, also Vorgängen, die klassischerweise mit Karzinogenese assoziiert sind (Abdel-Wahab und Levine, 2013; Arrowsmith et al., 2012). Unter dem Aspekt der potentiellen Reversibilität epigenetischer Modifikationen sind diese pharmakologisch beeinflussbar und stellen somit wichtige Angriffsziele dar. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass identifizierte Onkoproteine bisher mit wenigen Ausnahmen schlecht durch zielgerichtete Therapien inhibiert werden können, so zum Beispiel auch Myc. Durch epigenetische Regulation ist die Expression der jeweiligen Onkogene

allerdings zu beeinflussen, dies ist daher eine denkbare therapeutische Option (Arrowsmith et al., 2012).

Epigenetische Merkmale, die mit Krebs assoziiert werden, sind z.B. eine generelle Hypomethylierung der DNA, die zur genomischen Instabilität führt. Aber auch gewisse Histonmodifikationen sind mit onkogener Transformation in Verbindung zu bringen (Lim, 2009). Da auch Histon Methylierung ein reversibler Prozess ist (Shi et al., 2004), ist eine Manipulation der beteiligten Enzyme im Rahmen einer „Targeted Therapy“ ein attraktives Ziel (Lynch et al., 2013). Im Bezug auf viele hämatologische Neoplasien, die Thema dieser Arbeit sind, sind neue Therapiestrategien vor allem für ältere Patienten, die insgesamt häufiger betroffen sind, erforderlich, um Prognoseverbesserungen zu erreichen, da die akutell oftmals einzige kurative Option einer allogenen Stammzelltransplantation von älteren Patienten schlecht toleriert wird und somit im höheren Alter selten durchgeführt wird (Germing et al., 2013).

Dass die Beeinflussung epigenetisch wirksamer Enzyme grundsätzlich eine therapeutische Option ist, zeigt sich schon jetzt in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen. Hier sind mittlerweile für bestimmte Patientengruppen, die unter speziellen MDS- oder AML-Formen leiden, Azacithidin und Decitabin, zwei DNMT-Inhibitoren, zugelassen. In der Hochrisiko-Patientengruppe, die aufgrund ihres Alters keiner allogenen Stammzelltransplantation zugeführt werden kann, hat dies zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens geführt (Garcia-Manero et al., 2010; Herold 2013a). Diese Medikamente kommen auch für die Behandlung der dysplastischen CMML Varianten in Frage (Hofmann et al., 2013). Die Wirkung der DNMT-Inhibitoren wird darin begründet, dass trotz genereller Hypomethylierung der DNA in Krebszellen, eine Überexpression von DNMT1 zu Hypermethylierung von Promotoren von Tumorsuppressorgenen und damit zu deren Repression führt (Virani et al., 2012). Ein weiteres Molekül mit vergleichbarem Mechanismus ist Zebularin, welches mit verlängerter Halbwertszeit und besserer Selektivität für Tumorzellen in Verbindung gebracht wird (Cheng et al., 2004); es liegen aber kaum Informationen bezüglich möglicher klinischer Verwendung vor (Gnyszka et al., 2013).

Auch Deacetylaseinhibitoren (HDACi) werden als therapeutische Option bei einigen Formen des MDS aber auch in der AML diskutiert (Jabbour und Garcia-Manero, 2014). Als Beispiel sind hier Vorinostat und Romidepsin zu nennen, die bei bestimmten Formen von T-Zell Lymphomen bereits zum Einsatz kommen (Di Costanzo et al., 2014; Rodriguez et al., 2009). Allerdings ist ihr Stellenwert wegen einer ausgeprägten Hämatotoxizität in der Behandlung des MDS bisher gering (Hofmann et al., 2013). Eine ganze Reihe weiterer spezifischer Inhibitoren wird im Rahmen klinischer Studien getestet (Arrowsmith et al., 2012).

Bei einigen Formen von Leukämien wurde eine Überexpression von Histonmethyltransferasen gezeigt (Hess, 2004). Diese transferieren Methylgruppen in einem einheitlichen Reaktionsschritt S-Adenosylmethionin-abhängig. Demnach gibt es therapeutische Bemühungen auch hier spezifische Enzyme zu inhibieren, zum Beispiel die Histon-Lysin N-Methyltransferase EZH2 (McCabe und Creasy, 2014). Eine andere mögliche Zielstruktur wird in dem MLL1 Protein gesehen, das durch das MLL-Gen kodiert wird. Es kommt in manchen Fällen von AML, aber auch ALL, durch Translokationen zur Bildung von verschiedenen MLL-Fusionsgenen, die eine Überexpression assoziierter Gene bedingen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Vu et al., 2013). In Zellkulturen konnten MLL-mutierte Leukämiezellen mittels eines spezifischen Inhibitors von DOT1L, einer durch Bildung des Fusionsgens überexprimierten Methyltransferase, selektiv angegriffen werden bei einem minimalen Effekt auf Zellen ohne entsprechendes Fusionsgen (Daigle et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass dies durch die Induktion von Zellzyklusarrest, Apoptose und myeloider Differenzierung geschieht ohne dabei nicht mutierte Zellen zu schädigen (Cao et al., 2014). Seit September 2012 laufen dementsprechend bereits klinische Studien zur Erprobung eines spezifischen MLL1 Inhibitors mit dem Namen „EPZ-5676“ in MLL-mutierten Leukämien (National Library of Medicine, 2014a).

Eine weitere diskutierte Therapieoption ist es, die sogenannten „Leser“ des Histon Codes pharmazeutisch zu beeinflussen (Dawson et al., 2012). Hier konnte die Bromodomain-Proteinfamilie identifiziert werden, die in der Lage ist, acetylierte Lysine innerhalb von Histonen zu binden. Inhibition des Familienmitgliedes BRD4 durch JQ1,

einem spezifischen Inhibitor, führte zu signifikant geringerer Expression von Myc und zu verbesserter Überlebenszeit in Mäusen, bei denen eine MLL-mutierte Leukämie induziert worden war. Andere Versuche zeigten auch einen positiven Effekt in speziellen ALL-Formen (Ott et al., 2012). Erste klinische Studien sind angelaufen, um die in-vivo Eigenschaften identifizierter Moleküle zu testen (Arrowsmith et al., 2012).

1.2.4 LSD1-Inhibitoren als Therapieoption

Vor dem Hintergrund dieser Entwicklungen erscheint auch eine therapeutische Inhibition von LSD1 im Falle von Überexpression oder aktivierenden Mutationen in den zuvor genannten Krankheitsentitäten als potente Therapieoption denkbar (Lynch et al., 2012). Schon seit Längerem ist bekannt, dass unselektive MAOi (v.a. Tranylcypromin), die zur Behandlung bestimmter affektiver Störungen zugelassen sind, die katalytische Aktivität von LSD1 effektiv vermindern (Lee et al., 2006; Schmidt und McCafferty, 2007). Da diese Substanzgruppe durch die Beeinflussung verschiedener Neurotransmitter nebenwirkungsreich ist und auch in der Behandlung von Depressionen meist nicht die erste Wahl darstellt (Shulman et al., 2013), ist es sinnvoll, spezifischere Inhibitoren zu identifizieren, die einen geringeren Effekt auf den Metabolismus von Neurotransmittern haben. Es wurden diverse Substanzen auf ihren möglichen Einsatz als selektive LSD1 Inhibitoren getestet. Eine Studie beschäftigte sich zum Beispiel damit, einen Surrogatmarker für effiziente LSD1 Inhibition zu identifizieren, um das Screening auf neue LSD1 Inhibitoren zu erleichtern. Hier konnte das CD86 ausgemacht werden (Lynch et al., 2013). Aktuell wird eine Vielzahl an Molekülen auf einen möglichen Einsatz als LSD1 Inhibitor überprüft (Zhou et al., 2014).

Präklinische in-vitro Studien beschreiben einen vielversprechenden Therapieansatz im Konzept LSD1 Inhibition, gerade auch zur Behandlung der AML (Harris et al., 2012; Lynch et al., 2012). Auch im Tiermodell zeigt dieses Konzept gute Effekte bei geringer Toxizität (Fiskus et al., 2014).

Aufgrund dieser verheißungsvollen Ergebnisse werden aktuell Klinische Studien der Phase I / II durchgeführt, um wirksame Dosierungen bei tolerabler Toxizität zu finden

und in einem zweiten Schritt zu testen, ob ein positiver Effekt an Erkrankten nachgewiesen werden kann.

Hier ist zum einen der Pharmakonzern GlaxoSmithKline zu nennen, der den Einsatz eines selektiven LSD1 Inhibitoren namens GSK2879552 seit Februar 2014 im refraktären kleinzelligen Bronchialkarzinom (National Library of Medicine, 2014c) und seit August 2014 bei refraktären AML Fällen im Rezidiv testet (National Library of Medicine, 2014b). Die Ergebnisse dieser Studien werden 2016 erwartet.

Ferner läuft eine Studie der Universität Halle-Wittenberg, die die Effekte von LSD1-Inhibition in Kombination mit ATRA in Therapie-refraktären AML Fällen testet. Seit September 2014 rekrutiert diese Phase I / II Studie AML Patienten, denen ATRA in Kombination mit Tranylcypromin oral verabreicht wird. Die Ergebnisse dieser Studie werden 2017 erwartet (National Library of Medicine, 2014d).

Da LSD1 wie zuvor erwähnt seine Wirkung oft im Komplex mit HDAC1 ausübt, ist es ebenfalls denkbar, dass eine synergistische Wirkung bei gleichzeitiger HDAC Inhibition auftritt (Yang et al., 2007). Eine Studiengruppe hat den Effekt einer gleichzeitigen Inhibition verschiedener Gruppen von Demethylasen in Prostata- und Kolonkarzinomzellen untersucht und vielversprechende Ergebnisse gezeigt (Rotili et al., 2014). Diese Feststellungen suggerieren, dass für bestimmte Erkrankungen auch Kombinationstherapien denkbar sind und erwogen werden sollten.

Aufgrund der zunehmenden Evidenz, dass epigenetische Veränderungen in Krebserkrankungen von zentraler Bedeutung sind und aufgrund dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse, werden epigenetische Angriffspunkte in der Krebstherapie zukünftig von noch größerer Bedeutung sein (Dawson und Kouzarides, 2012).

1.3 Fragestellung der Arbeit

LSD1 Überexpression wurde in zahlreichen malignen Tumoren nachgewiesen, somit scheint es sich hierbei um ein häufiges Phänomen im Rahmen maligner Entartung zu handeln. Einer hohen LSD1 Expression wird auch eine potentielle Beteiligung an dem Differenzierungsblock der Blasten in der akuten myeloischen Leukämie, einer hoch malignen hämatologischen Krankheit, zugesprochen.

Aufgrund der zunehmenden präklinischen Hinweise, dass LSD1-Inhibition in AML und soliden Tumoren eine therapeutische Option darstellen könnte, ist die Zielsetzung dieser Arbeit, erstmals eine mögliche Überexpression dieses Enzyms in einer Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen neben der AML zu überprüfen, da diese bisher nicht untersucht wurde. Hierbei wird bewusst die Expression auf Proteinebene untersucht, die letztendlich die Relevanz für das Tumorgewebe besser reflektiert als die RNA-Ebene. Die Fragestellung der Arbeit lautet, ob LSD1 in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen neben der AML überexprimiert ist und wenn ja, in welchen. Die Beantwortung dieser Fragestellung kann zukünftig sowohl diagnostische als auch therapeutische Relevanz erlangen.

Da das Verständnis verschiedener hämatologischer neoplastischer Erkrankungen für die Einordnung der Ergebnisse substanziell ist, folgt an dieser Stelle eine Darstellung der untersuchten Erkrankungen. Hierbei sollen vor allem diagnostische Besonderheiten herausgearbeitet werden.

1.4 WHO Klassifizierung hämatologischer Neoplasien

Die Untersuchungen in dieser Arbeit beruhen auf der aktuellen Klassifikation maligner hämatologischer Erkrankungen, der revidierten „Classification of hematological and lymphoid neoplasms“ der WHO aus dem Jahr 2008. Diese beschreibt zwölf übergeordnete Hauptgruppen, die sich ihrerseits in zahlreiche Untergruppen aufteilen, siehe Tabelle 2.

Tab. 2: WHO Klassifikation hämatopoetischer und lymphatischer Neoplasien

Die Einteilung in zwölf Hauptgruppen orientiert sich vor allem an der Differenzierung der zu Grunde liegenden entarteten Zelle und in vielen Fällen an genetischen Merkmalen. Weitere Kriterien sind teilweise die Ätiologie oder auch histologische Wachstumsmuster. Die Klassifikation wird entsprechend neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in unregelmäßigen Abständen aktualisiert; diese Arbeit bezieht sich auf die aktuelle Version von 2008.

| | |
|-----|--|
| 1. | Myeloproliferative Neoplasien |
| 2. | Myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Aberration von PDGFRA, PDGFRB oder FGFR1 |
| 3. | Myelodysplastische / myeloproliferative Neoplasien |
| 4. | Myelodysplastische Syndrome |
| 5. | Akute myeloische Leukämie und verwandte Vorläuferzell-Neoplasien |
| 6. | Akute Leukämien unklarer Zelllinie |
| 7. | Lymphatische Vorläuferzell-Neoplasien |
| 8. | Reife B-Zell-Neoplasien |
| 9. | Reife T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien |
| 10. | Hodgkin Lymphom |
| 11. | Histiozytische- und Dendritische-Zell-Neoplasien |
| 12. | Lymphoproliferative Erkrankungen nach Transplantation (PTLD) |

Hier sollen zum besseren Verständnis kurz die jeweiligen Hauptmerkmale und Diagnosekriterien der untersuchten Krankheitsentitäten skizziert werden.

1.4.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Die Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien entspricht klonalen Stammzellerkrankungen des Knochenmarks, die zu einer abnormen Vermehrung der zellulären Bestandteile des Blutes führen. Diese vermehrten Zellen sind meist normal differenziert, können aber ihrerseits zu Krankheitssymptomen führen, wie zum Beispiel zu Thromboseneigung oder aber auch Blutungsneigung. Ein weiteres gängiges Phänomen im Krankheitsverlauf ist extramedulläre Blutbildung durch zunehmende Fibrosierung des anfangs hyperzellulären Knochenmarks mit assoziierter Vergrößerung von Milz und Leber (Hepatosplenomegalie). Die extramedulläre Blutbildung lässt sich unter anderem an vermehrtem Auftreten unreifer Vorstufen der Blutzellen im peripheren Blut nachweisen (Herold, 2013a).

Außer den im Folgenden aufgeführten, in dieser Arbeit untersuchten, häufigeren MPN, zählt man auch die chronische Neutrophilenleukämie, die chronische Eosinophilenleukämie, Mastozytosen und das hypereosinophile Syndrom zu dieser Gruppe (Vardiman et al., 2008a). Die Differenzierung der verschiedenen Krankheiten ist nur durch klinische, histologische und molekulargenetische Merkmale möglich. Generell kann es im Verlauf zu einer Vermehrung von Blasten kommen, wobei ein Anteil von 10-19 % im Knochenmark als akzelerierte Krankheitsphase und ein Blastenanteil über 20 % als Blastenkrise bezeichnet werden können (Vardiman et al., 2008a).

1.4.1.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die CML ist vor allem durch eine exzessiv gesteigerte Produktion von Granulozyten und deren Vorstufen gekennzeichnet, die zu einer peripheren Leukozytose führen, die extrem ausgeprägt sein kann. Meist ist sie eine Erkrankung des mittleren Lebensalters bei einer weltweiten Inzidenz von 1-2/100.000 pro Jahr (Vardiman et al., 2008b). Der Übergang in eine Blastenkrise, die in ihrem Verlauf einer akuten Leukämie entspricht, tritt bei dieser Krankheit unbehandelt nach Jahren des stabilen Krankheitsverlaufs regelhaft und somit von allen MPN Formen am häufigsten auf (Hochhaus et al., 2013).

Typisch für die CML ist, wie bereits in der Einleitung aufgeführt, die Translokation t(9;22)(q34;q11) mit Bildung des sogenannten Philadelphia-Chromosoms, das bei bis zu 95 % der Patienten zu finden ist und zu einer dauerhaft aktivierten Tyrosinkinase führt, welche einen ständigen Proliferationsreiz und ein Apoptose-hemmendes Signal darstellt (Herold, 2013a). Die Entwicklung von Imatinib und weiteren Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hat zu einer deutlichen Prognoseverbesserung geführt (Hehlmann et al., 2007). Aufgrund des häufigen Fehlens von Symptomen sind Zufallsbefunde bei Routineblutuntersuchungen nicht selten. Differenzialdiagnostisch ist im Gegensatz zu anderen MPN und der CMML zytochemisch eine Erniedrigung der alkalischen Leukozytenphosphatase nachweisbar (Vardiman et al., 2008b). Im Gegensatz zur CML kommen bei reaktiven Leukozytosen keine Myeloblasten im Blut vor. Eine Knochenmarkhistologie sollte in Abgrenzung zu anderen MPNs und zur Bestimmung des Fibrosegrades durchgeführt werden (Hochaus et al., 2013).

1.4.1.2 Polyzythämia Vera (PV)

Charakteristisch für die PV ist eine Vermehrung der Erythropoese, die zu einem abnormen Anstieg des Hämatokrits führt; teilweise tritt gleichzeitig eine Erhöhung der Thrombozyten und Leukozyten auf. Die vermehrt produzierten roten Blutzellen sind dabei in der Regel normochrom und normozytär (Thiele et al., 2008a). Die PV ist etwas seltener als PMF und CML, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 60 Jahren mit einer Dominanz des männlichen Geschlechtes und starken geografischen Unterschieden (Herold, 2013a).

In bis zu 95 % der Fälle findet sich ursächlich eine Mutation im JAK2-Gen (rezeptorassoziierte Januskinase), die zu einer konstitutiven Aktivierung des Erythropoetin (EPO) Signalweges führt, auch in Abwesenheit dieses Wachstumsfaktors (Lengfelder et al., 2014). Das klinische Bild ist bestimmt durch die Folgen der Erythrozytose und entsprechender Hyperviskosität des Blutes; folglich ist der Aderlass eine wichtige Therapiemodalität, um thrombembolische Ereignisse zu verhindern. Allerdings sind die Thrombozyten oft dysfunktional und auch hämorrhagische Diathesen kommen vor. Diagnosekriterien sind laut WHO getrennt in Haupt- und Nebenkriterien

gegliedert, um laborchemisch und klinisch die Wahrscheinlichkeit einer PV zu überprüfen (Thiele et al., 2008a). Differenzialdiagnostisch wichtig ist hier z.B. der Ausschluss einer sekundären Polyglobulie, die u.a. bei chronischer Hypoxie auftreten kann, also beispielweise bei Lungenerkrankungen. In der histologischen Untersuchung des Knochenmarks ist eine Hyperzellularität und das Fehlen von anfärbbarem Speichereisen charakteristisch, während Zellatypien meist nicht nachweisbar sind. Der EPO Spiegel im Blut ist häufig vermindert (Thiele et al., 2008a).

Sekundär kann die PV in eine AML, MDS oder auch PMF fortschreiten; die Prognose ist jedoch innerhalb der MPN als günstig zu bewerten (Lengfelder et al., 2014).

1.4.1.3 Primäre Myelofibrose (PMF)

Die PMF ist ebenfalls eine klonale Stammzellerkrankung, bei der im Verlauf der Krankheit nach einer hyperproliferativen Phase, die durch erhöhte Zellzahlen vor allem der Leukozyten und Thrombozyten im peripheren Blut gekennzeichnet ist, das Knochenmark fibrotisch umgebaut wird. Folge ist eine ausgeprägte extramedulläre Blutbildung, die zu teilweise massiver Hepatosplenomegalie führt (Herold, 2013a). Die Blutbildung außerhalb des Knochenmarks ist insuffizient, es werden Vorstufen der Blutzellen ins Blut ausgeschwemmt, dies resultiert in Anisozytose und im weiteren Verlauf kommt es zu Panzytopenie. Etwa die Hälfte der Patienten weist Mutationen im JAK2-Gen auf, einige auch Mutationen im MPL-Gen oder CALR-Gen (MPL-Gen: „myeloproliferative leukemia virus oncogene“, kodiert für Thrombopoetin-Rezeptor; CALR-Gen: kodiert für Calreticulin). Diese Mutationen können allerdings auch bei anderen MPN auftreten und sind somit nicht spezifisch. Die Inzidenz beträgt etwa 1/100.000 pro Jahr bei ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (Thiele et al., 2008c). Wie bei der PV gibt es definierte Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnosestellung (Thiele et al., 2008c). Typisch ist, dass im Rahmen der Knochenmarkpunktion kein Aspirat gewonnen werden kann, dies nennt man „Punctio sicca“. Gleiches kann allerdings auch im Rahmen anderer Krankheiten auftreten. Differenzialdiagnostisch ist es wichtig, eine sekundäre Myelofibrose im Rahmen anderer MPN sowie ein MDS auszuschließen. Auch weitere Erkrankungen können sich mit Knochenmarkfibrose

präsentieren, dazu zählen etwa die Haarzelleukämie oder auch die Knochenmarkinfiltration eines soliden Tumors mit sekundärer Fibrose des Knochenmarks. Eine Behandlung wird abhängig von Symptomatik, Alter und gemäß prognostischer Scores wie dem IPSS bei PMF geplant, da der klinische Verlauf sehr variabel ist (Grießhammer et al., 2014).

1.4.1.4 Essentielle Thrombozythämie (ET)

Die ET ist eine MPN mit dominierender langfristiger Erhöhung von Thrombozyten durch Zytokin-unabhängige Steigerung der Thrombopoese. Die Inzidenz und der Altersgipfel sind der PV vergleichbar, also etwa 0,6-2,5/100.000 pro Jahr bei meist ca. 60-Jährigen, allerdings bei ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (Thiele et al., 2008 b). Wie bei der PMF liegt die JAK2-Mutation in etwa 50 % der Fälle vor, die oben genannten weiteren möglichen Mutationen definieren verschiedene Krankheitssubtypen (Petrides et al., 2014). Die Erkrankung ist anfangs oft asymptomatisch; wie bei anderen MPN können Thrombembolien oder auch Blutungen (durch dysfunktionale Thrombozyten) auftreten (Herold, 2013a).

Eine sekundäre Thrombozytose, z.B. im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, und ein Eisenmangel müssen als Ursache erhöhter Thrombozytenwerte ausgeschlossen werden, gerade auch weil der Grenzwert der Thrombozytenzahl als eines der Hauptkriterien nach WHO Klassifizierung mit der letzten Revision im Jahre 2008 auf über 450.000 / μ l Blut statt vormals über 600.000 / μ l gesenkt wurde (Thiele et al., 2008b). Im Blutaussstrich fällt eine Anisozytose der Blutplättchen auf und im Knochenmark finden sich mitunter sehr große Megakaryozyten. Die Differenzialdiagnose zu den anderen MPN und MDS kann schwierig sein und ist manchmal erst im Verlauf möglich; hier nimmt die Knochenmarkhistologie eine wichtige Stellung ein. Ein sekundärer Übergang in MDS oder akute Leukämien ist vergleichbar selten, somit ist die Prognose innerhalb der MPN gut und bei vielen Patienten ist die Lebenserwartung kaum verringert (Petrides et al., 2014; Thiele et al., 2008b).

1.4.2 Myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Aberration von PDGFRA, PDGFRB und FGFR1

Diese Gruppe wurde mit der Überarbeitung der Klassifizierung 2008 neu eingeführt und ist durch Mutationen in bestimmten Rezeptoren bei gleichzeitiger Eosinophilie definiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche Fälle nicht untersucht, da sie seltene Krankheitsbilder darstellen.

1.4.3 Myelodysplastische / myeloproliferative Neoplasien

Diese Gruppe nimmt eine Zwischenstellung zwischen MDS und MPN ein, da jeweils Merkmale beider Hauptgruppen vorkommen. Innerhalb dieser Arbeit wurde das Krankheitsbild der CMML untersucht, welche dieser Gruppe zugeordnet wird. Des Weiteren fallen z.B. das sogenannte RARS-T, das einer refraktären Anämie mit Ringsideroblasten bei gleichzeitiger Thrombozytose entspricht, und weitere seltene Subgruppen, wie die atypische CML, in diese Kategorie.

Chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML)

Die Chronisch myelomonozytäre Leukämie ist eine Krankheit, die als Mischbild aus MDS und MPN betrachtet werden kann, da sie Charakteristika beider Krankheitsgruppen aufweist.

Typisch ist ein fehlendes Philadelphia Chromosom bei gleichzeitiger Monozytose des peripheren Blutes und Dysplasiezeichen mindestens einer Zellreihe im Knochenmark (Hofmann et al., 2013). Die Gesamtzahl der Leukozyten ist in der Regel ebenfalls erhöht, kann in einigen Fällen aber auch normal oder vermindert sein. Somit ähneln manche Krankheitsfälle eher einer MPN, andere eher einem MDS, demnach ist es im Ganzen eine eher heterogene Gruppe (Orazi, 2007). Abhängig von der Anzahl an Blasten spricht man von CMML I (<10 % Blasten im Knochenmark, <5 % im Blut) und CMML II (<20 % Blasten im Knochenmark, <20 % im Blut). In der Diagnostik werden zytochemische (z.B. Nicht-spezifische Esterase) oder immunhistochemische (z.B. CD13, CD33) Untersuchungen zur besseren Identifizierung der monozytären Zellen

empfohlen. Die Angaben zur Inzidenz schwanken stark, allerdings tritt die CMML gehäuft ab dem achten Lebensjahrzehnt und bevorzugt bei Männern auf. Ein Progress zur AML ist mit bis zu 30 % häufig, die Blastenzahl ist das wichtigste prognostische Kriterium (Orazi et al., 2008).

1.4.4 Myelodysplastische Syndrome (MDS)

MDS ist eine Sammelbezeichnung für klonale Stammzellerkrankungen, die mit Dysplasiezeichen in einer oder mehreren Zellreihen und meist peripherer Zytopenie einhergehen. Die gebildeten Zellen sind dabei typischerweise dysfunktional und undifferenziert, somit sind abnorme Zellen wie z.B. Riesenplättchen und eine ausgeprägte Anisozytose im Blutausschlag üblich (Herold, 2013a). Die Krankheit tritt typischerweise im höheren Lebensalter auf (erhöhte Inzidenz ab ca. 70 Jahren) und ist mit 3-5/100.000 pro Jahr innerhalb der hämatopoetischen Neoplasien häufig (Brunner et al., 2008). Eine Akkumulation genetischer Aberrationen ist kennzeichnend (komplexe Veränderungen des Karyotyps oder auch isolierte Mutationen wie z.B. eine Deletion auf Chromosom 5); verschiedene Mutationen sind von prognostischer Relevanz und lassen sich bei bis zu 50 % der Patienten nachweisen (Hofmann et al., 2013). Ebenfalls sehr wichtig ist die Anzahl von Blasten im Knochenmark, da MDS-Erkrankungen im Verlauf durch Blastenvermehrung zur AML fortschreiten können. Dies tritt in den verschiedenen Subgruppen unterschiedlich oft ein. Daher dient die Blastenzahl gemeinsam mit histopathologischen und zytogenetischen Kriterien zur weiteren Einteilung dieser Hauptgruppe nach WHO, siehe Tabelle 3.

Tab. 3: Klassifikation des MDS

Für alle Subgruppen des MDS wird die Abwesenheit einer Monozytose über 1.000 / μ l Blut gefordert; bei Vorliegen ist die Diagnose CMML in Erwägung zu ziehen. Dysplasien müssen jeweils in >10 % der Zellen einer Zellreihe im Knochenmark vorliegen. Andere diagnostische Kriterien unterscheiden sich jeweils anhand der Parameter im peripheren Blut und im Knochenmark. Im Laufe einer Erkrankung kann häufig ein Progress festgestellt werden; letztlich können auch akute Leukämien auftreten. Die Häufigkeiten dieser definierten Gruppen innerhalb aller MDS Patienten werden wie folgt angegeben (Brunner et al., 2008): RCUD: 10-20 % (darunter am häufigsten RA), RARS: 3-11 %, RCMD: 30 %, RAEB I & RAEB II: 40 %. Die anderen Formen sind seltener.

Abkürzungen: RCUD: Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie; RA: Refraktäre Anämie; RT: Refraktäre Thrombozytopenie; RN: Refraktäre Neutropenie; RARS: RA mit Ringsideroblasten; RCMD: Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie, MDS del 5q: MDS mit isolierter Deletion 5q; RAEB: Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss; MDSU: MDS unklassifizierbar, RCC: Refraktäre Zytopenie in der Kindheit. Vereinfacht nach (Brunner et al., 2008).

| MDS-Typ | Diagnosekriterien | |
|-------------------------|--|--|
| | Blut | Knochenmark |
| RCUD (RA, RT, RN) | Zytopenie einer oder zweier Zellreihen: (Anämie / Thrombozytopenie / Neutropenie), <1 % Blasten | <5 % Blasten, Dysplasie einer Zellreihe, <15 % Ringsideroblasten |
| RARS | Anämie, <1 % Blasten | <5 % Blasten, Dyserythropoese, >15 % Ringsideroblasten |
| RCMD | Zytopenie(n), <1 % Blasten | zusätzlich Dysplasie mind. einer weiteren Zellreihe, Ringsideroblasten fakultativ |
| MDS del 5q | Anämie, <1 % Blasten | <5 % Blasten, Nachweis del 5q |
| RAEB I | Zytopenie(n), <5 % Blasten | 5-9 % Blasten, Dysplasie einer oder mehrerer Zellreihen |
| RAEB II | Zytopenie(n), <20 % Blasten | 10-19 % Blasten, Dysplasie einer oder mehrerer Zellreihen |
| MDSU | Zytopenie(n), <1 % Blasten | <5 % Blasten |
| RCC | Zytopenie(n), <2 % Blasten | <5 % Blasten, Dysplasie einer oder mehrerer Zellreihen |

Kennzeichen des MDS im Knochenmark sind Kernatypien verschiedener Art. Im Rahmen der Dysgranulopoese kommen u.a. eine Hypolobulierung und hypersegmentierte Zellen vor. Eine Dyserythropoese zeigt sich neben diversen nukleären Veränderungen teilweise durch Ringsideroblasten, die eine vermehrte Eisenspeicherung im Knochenmark anzeigen. Dysmegakaryopoese erkennt man z.B. an Mikromegakaryozyten (Brunning et al., 2008; Herold 2013a).

In Abgrenzung zu reaktiven Veränderungen werden Zelldysplasien in mindestens 10 % der Zellen einer Zelllinie gefordert. Es gibt viele weitere Differenzialdiagnosen, die beachtet und ausgeschlossen werden müssen, neben MPN und akuten Leukämien z.B. auch Anämien verschiedener Genese und toxische oder infektiöse Knochenmarkschäden; daher ist die Beachtung der Anamnese von großer Bedeutung (Hofmann et al., 2013; Orazi, 2007).

Vor allem bei den Formen mit erhöhter Anzahl von Blasten ist ein Übergang in eine akute Leukämie relativ häufig. Eine Risikostratifizierung erfolgt unter anderem unter Verwendung des sogenannten International Prognostic Scoring Systems (IPSS), das auf der Anzahl an Blasten, dem Karyotyp und dem Vorliegen und der Ausprägung von Zytopenien beruht, und auf dessen Grundlage eine therapeutische Strategie festgelegt wird (Hofmann et al., 2013).

1.4.5 Akute myeloische Leukämien (AML)

Die Akute myeloische Leukämie zeichnet sich durch eine Proliferation von monoklonalen myeloischen Blasten aus, die im Knochenmark oder im peripheren Blut 20 % übersteigen (Herold, 2013a). Der myeloische Ursprung kann meist anhand des Nachweises der Expression von CD13, CD33 und CD65 gezeigt werden, allerdings unterscheiden sich die vielen Untergruppen durch die Expression weiterer spezifischer Marker, je nach vorhandener Differenzierung (Estey, 2013; Orazi, 2007). Die Krankheit tritt mit einer Inzidenz von etwa 3/100.000 pro Jahr auf und ist in ihrer Primärmanifestation heterogen, sie führt aber unbehandelt durch Verdrängung der normalen Hämatopoese mit folgender Panzytopenie rasch zum Tod. Meist tritt sie bei Erwachsenen, vor allem bei älteren Patienten auf (Büchner et al., 2014).

Differenzialdiagnostisch müssen die Blasten initial mittels Zytochemie, Durchflusszytometrie und genetischen Analysen genau charakterisiert werden, um eine passende Einteilung mit bestmöglicher Therapieplanung und eine Abgrenzung gegenüber lymphatischen Leukämien zu ermöglichen. Verschiedene genetische Veränderungen können regelmäßig in den malignen Zellen nachgewiesen werden. Man unterscheidet dabei Klasse 1 Mutationen, die die Proliferation oder das Überleben der Zelle beeinflussen von Klasse 2 Mutationen, die hämatopoetische Differenzierung und Apoptose beeinflussen (Vardiman et al., 2008a). Die Bestimmung der häufigsten Mutationen im Rahmen der Erstdiagnostik dient der Risikostratifizierung und sollte heute standardmäßig bei allen Patienten durchgeführt werden (Kühnl und Grimwade, 2012). Zu diesen Untersuchungen zählt u.a. die Bestimmung des Karyotyps, der Nachweis der NPM1-Mutation, der CEBPA Mutation und der FLT3-ITD Mutation. Die ersten beiden Mutationen sind mit einer günstigeren Prognose, die letztere mit einer ungünstigeren assoziiert (Dohner et al., 2005; Frohling et al., 2002; Frohling et al., 2004; Schnittger et al., 2005).

Die WHO Klassifikation legt im Gegensatz zu früheren Einteilungen hauptsächlich diese genetischen Aberrationen, daneben zytomorphologische und ätiologische Kriterien der Einteilung zu Grunde und unterscheidet hier folgende Hauptgruppen, die ebenfalls in dieser Arbeit herangezogen wurden (Vardiman et al., 2008a):

- AML mit definierten genetischen Aberrationen (9 Subgruppen)
- Therapieinduzierte AML
- AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
- AML, nicht weiter spezifiziert (11 Subgruppen)
- Myeloisches Sarkom
- Myeloische Proliferation assoziiert mit Down Syndrom (2 Subgruppen)
- Blastische plasmazytäre Dendritische-Zell Neoplasie

Innerhalb dieser Arbeit wurden Fälle der ersten vier genannten Hauptgruppen untersucht.

Ebenfalls noch gebräuchlich ist die FAB-Klassifikation, diese unterscheidet hauptsächlich anhand des Differenzierungsgrades und der Morphologie der malignen Zellen in AML M0-M7 und entspricht gemäß WHO größtenteils der Gruppe „AML, nicht weiter spezifiziert“:

M0: AML mit minimaler myeloischer Differenzierung

M1: Akute Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung

M2: Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung

M3: Akute Promyelozytenleukämie (APL)

M4: Akute myelomonozytäre Leukämie

M5: Akute monozytäre Leukämie

M6: Akute Erythroleukämie

M7: Megakaryoblastenleukämie

Verschiedene andere hämatologische Erkrankungen können in eine sogenannte Blastenkrise übergehen und somit sekundär zu einem Krankheitsbild entsprechend der AML transformieren. Dies trifft unter anderem auf MPN und MDS zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gruppe verallgemeinernd mit „Blastenkrise nach MPN“ benannt, die so in der WHO Definition nicht vorkommt. In dieser Gruppe wurden Fälle im Verlauf verschiedener MPN als Grunderkrankung subsummiert, die anhand der Anzahl von Blasten als AML definiert werden (Blastenanteil im Verlauf der Krankheit über den AML-definierenden Grenzwert von 20 % gestiegen).

1.4.6 Akute Leukämien unklarer Zelllinie

Diese Gruppe stellt mit verschiedenen Unterformen innerhalb der Leukämien einen Sonderfall dar, da die Blasten lymphatische und myeloische Merkmale aufweisen oder auch gänzlich undifferenziert sind. Solche Fälle wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

1.4.7 Lymphatische Vorläuferzell-Neoplasien

Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die akute lymphatische Leukämie ist ebenfalls durch eine klonale Vermehrung von Blasten gekennzeichnet; diese sind jedoch als entartete Vorläuferzellen von Lymphozyten zu betrachten. Wie bei der AML ist eine Verdrängung aller Zellreihen der Hämatopoese typisch, ferner ist ein blastärer Befall praktisch aller Organe möglich. Die ALL tritt im Gegensatz zur AML häufiger bei Kindern auf, sie ist sogar die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters, und zeigt häufig eine Infiltration von Meningen und Liquor. Die Gesamtinzidenz beträgt etwa 1/100.000 pro Jahr; betrachtet man eine Population im Alter unter fünf Jahren isoliert, liegt dieser Wert allerdings fünffach höher (Gökbuget et al., 2012). Anhand der immunhistochemischen oder durchflusszytometrischen Untersuchung einer Vielzahl von Oberflächenmarkern (u.a. CD1a, CD2, CD3 und CD10), anhand zytochemischer Untersuchung von PAS, saurer Phosphatase, Peroxidase und Esterase, und abhängig vom Reifegrad der entarteten Blasten erfolgt eine genaue Einteilung in Prä-, Pro-, common-, intermediäre und reife ALL vom B-Zell Typ oder T-Zell Typ. Dies charakterisiert den ursprünglich entarteten Zellklon und ist neben spezifischen genetischen Veränderungen prognostisch bedeutsam (Borowitz und Chan, 2008). Eine reife B-ALL ist dabei als leukämisch verlaufendes Burkitt Lymphom zu betrachten und gehört eigentlich in die Gruppe der reifen B-Zell Neoplasien (Gökbuget et al., 2012). B-ALL sind ca. sechsmal häufiger als T-ALL, die häufigste Form ist die common-B-ALL.

Analog zur AML existiert auch für die ALL eine FAB Klassifikation auf Grundlage der Morphologie, die allerdings an Bedeutung verliert:

- L1: Kindlicher Typ, vorwiegend kleine Blasten
- L2: Erwachsenen Typ, heterogene Zellpopulation
- L3: Burkitt Typ, vorwiegend Blasten

Zur Diagnosestellung wird eine Blasteninfiltration von über 25 % im Knochenmark gefordert. Die Leukozytenzahlen im Blut sind häufig normal, es können aber auch Leukozytosen und Leukopenien auftreten (Herold, 2013a).

Wie bei der AML ist es wichtig, eine Untersuchung auf häufige genetische Aberrationen durchzuführen, die einzelne Subgruppen definieren. So ist z.B. die t(9;22)(q34;q11) Translokation bei der ALL mit einer schlechten Prognose assoziiert, obwohl sie wie bei der CML die Tyrosinkinaseinhibitortherapie ermöglicht (Borowitz und Chan, 2008). Trotz Kenntnis genauerer Subklassifikationen innerhalb der WHO-Einteilung, wurden die Gruppen in dieser Arbeit vereinfachend nach B- und T-ALL eingeteilt, um ausreichende Gruppenstärken zu erreichen.

1.4.8 Reife B-Zell-Neoplasien

Diese Gruppe zeichnet sich durch eine besondere Vielfalt an Krankheitsbildern aus. Die klonale Expansion von lymphatischen Zellen im Rahmen einer Neoplasie wird allgemein „malignes Lymphom“ genannt, häufig auch nur „Lymphom“. Neoplastische Lymphome sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten, die man in Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphome unterteilt, die zweite Gruppe trennt man nach ihrer Reihenzugehörigkeit noch in B-NHL und T-NHL (Jaffe et al., 2008).

Die B-Zell Neoplasien in dieser Hauptgruppe sind verschiedenartige Erkrankungen, die sich abhängig vom Zeitpunkt der Entartung der zu Grunde liegenden lymphatischen Zelle unterscheiden und somit distinkte Immunphänotypen aufweisen. Hodgkin Lymphome nehmen im Rahmen der WHO Einteilung eine eigene Hauptgruppe ein. Während Lymphome anfangs auf einzelne Lymphknoten beschränkt sein können, tritt im unbehandelten Krankheitsverlauf regelhaft eine Disseminierung auf, folglich sind lymphatische Neoplasien in der Regel als Systemerkrankung aufzufassen. Ein umfassendes klinisches Staging ist wichtig für eine adäquate Stadieneinteilung, die der Therapieplanung dient. Es können neben dem Knochenmark auch parenchymatöse Organe und das ZNS befallen werden. Die Primärmanifestation kann auch abseits eines Lymphknotens auftreten, so zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt oder in der Haut, dies bezeichnet man als „extranodal“ (Herold, 2013a).

Man unterscheidet die biologisch niedrigmalignen bzw. „indolenten Lymphome“, die zwar einerseits meist einen langsamen Verlauf zeigen, andererseits aber meist nicht durch zytostatische Therapie heilbar sind, von den hochmalignen bzw. „aggressiven“ Lymphomen, die unbehandelt rasch zum Tode führen, demgegenüber aber einer kurativen Therapie zugänglich sind (Herold, 2013a). Es ist erwähnenswert, dass die Inzidenz der NHL im Gegensatz zu Hodgkin Lymphomen seit Jahren steigend ist und dafür bisher keine befriedigende Erklärung gefunden werden konnte (Stein, 2008).

Reife B-Zell Neoplasien sind innerhalb der lymphatischen Neoplasien mit 90 % die häufigsten, sie machen 4 % aller neuen Krebserkrankungen jährlich aus. Das DLBL und das folliculäre Lymphom sind die häufigsten Vertreter dieser Gruppe und machen 60 % der Fälle aus (Jaffe et al., 2008). Eine Diagnose ist meist nur mittels histologischer Untersuchung von betroffenem lymphatischem Gewebe und mittels immunhistochemischer und oft zytogenetischer Verfahren möglich, bei leukämischem Verlauf mit Ausschwemmung der malignen Zellen ins Blut ist dagegen eventuell die Diagnose durch Untersuchung von peripherem Blut möglich (Wendtner et al., 2012).

Hier werden nur die im Rahmen der Arbeit untersuchten B-Zell-Erkrankungen aufgelistet. Es gibt aber viele weitere Entitäten in dieser Gruppe, auch relativ häufige, wie das Multiple Myelom und andere Plasmazellerkrankungen oder die Haarzelleukämie, die in dieser Studie nicht untersucht wurden.

1.4.8.1 Niedrigmaligne B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)

Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL wird heutzutage als klonale Vermehrung kleiner, reifzelliger aber immuninkompetenter B-Lymphozyten angesehen, die massenhaft ins Blut ausgeschwemmt werden, daher der Name „Leukämie“. Gemäß aktueller WHO Klassifikation ist die CLL als indolentes B-Zell Lymphom zu betrachten, das einen leukämischen Verlauf hat; das entsprechende Krankheitsbild mit T-Zell Ursprung wird T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) genannt und wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da es deutlich seltener ist (Wendtner et al 2012). Zeigt sich das klinische Bild der CLL ohne eine leukämische Ausschwemmung spricht man von einem kleinzelligen

lymphozytischen Lymphom (SLL) (Müller-Hermelink et al., 2008). In dieser Arbeit wurde keine Trennung zwischen CLL und SLL vorgenommen. Die CLL ist mit einer Inzidenz von etwa 3/100.000 die häufigste Leukämie überhaupt, die Inzidenz steigt stark mit dem Lebensalter an (Herold, 2013a). Bei Patienten mit deutlicher anhaltender Lymphozytose sollte der Verdacht auf CLL durch Immunphänotypisierung erhärtet oder ausgeschlossen werden (B-CLL Phänotyp: CD5, CD19, CD20, CD23 positiv, Leichtkettenrestriktion) (Wendtner et al., 2012). Dies dient auch der Abgrenzung anderer leukämisch verlaufender Lymphome (z.B. Mantelzelllymphom). Eine Immunelektrophorese kann die Monoklonalität der Lymphozyten beweisen, die als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu reaktiven Leukozytosen zu sehen ist. Allerdings ist auch eine weitere wichtige Differenzialdiagnose, die monoklonale Lymphozytose unklarer Signifikanz (MBL), in Erwägung zu ziehen, die sehr häufig bei älteren Menschen vorkommt (Müller-Hermelink et al., 2008).

Obwohl eine Knochenmarkinfiltration und Organinfiltration auftreten kann, ist eine Knochenmarkpunktion zur Diagnosestellung nicht obligat. Ein sekundärer Übergang in ein hochmalignes Lymphom wird in ca. 5 % der Fälle beobachtet und als Richter-Syndrom bezeichnet, bei Verdacht sollte eine Lymphknotenbiopsie angestrebt werden (Wendtner et al., 2012).

Da die CLL oft zufällig diagnostiziert wird, erfolgt die Therapie Stadien- und Symptomabhängig unter Berücksichtigung von Komorbiditäten; es haben sich spezielle klinische Einteilungen als Entscheidungshilfe etabliert (Binet-Klassifikation, Rai-Klassifikation) (Herold, 2013a). Spezifische genetische Aberrationen haben mit Ausnahme der Deletion 17p13 bisher keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung (Wendtner et al., 2012).

Marginalzonenlymphom

Marginalzonenlymphome entstehen gehäuft im lymphatischen Gewebe des Gastrointestinaltraktes, dem „Mucosa-Associated-Lymphatic-Tissue“ (MALT), vor allem bei *Helicobacter Pylori* Besiedlung oder anderen infektiösen pathogenen Reizen; sie kommen aber auch als nodales oder splenisches Marginalzonenlymphom vor (Herold, 2013a). Die extranodalen Lymphome treten dabei am häufigsten im Magen auf, können aber fast jedes Organ befallen (z.B. Lunge, Speicheldrüsen, Darm, Haut) (Koch et al.,

2012). Marginalzonenlymphome finden sich gehäuft bei Autoimmunerkrankungen wie dem Sjögren-Syndrom oder der Hashimoto-Thyreoditis (Isaacson et al., 2008).

Diese Entität leitet sich aus kleinen transformierten Zellen der Marginalzone ab, diese sind CD10, CD23 und Cyclin D1 negativ. Da es keinen spezifischen Immunphänotyp gibt, ist „Marginalzonenlymphom“ eine Ausschlussdiagnose (Isaacson et al., 2008). Häufig findet sich die Translokation $t(11;18)(q21;q21)$, es können aber auch andere Translokationen vorliegen. Auch die Abgrenzung zu entzündlichen Veränderungen kann schwierig sein; ein Klonalitätsnachweis und immunhistochemische Untersuchungen sind sehr wichtig, allerdings ist auch die Abgrenzung zu anderen indolenten Lymphomen wie der CLL und folliculären Lymphomen nicht trivial (Koch et al., 2012). In dieser Arbeit wurde vereinfachend eine gemeinsame Gruppe aus nodalen, extranodalen und splenischen Marginalzonenlymphomen gebildet, die in der WHO Klassifikation getrennt betrachtet werden.

Follikuläres Lymphom

Dies ist das zweithäufigste B-NHL nach dem DLBL und somit das häufigste niedrigmaligne Lymphom. Es tritt meist in einem Alter von etwa 60 Jahren auf, mit einer Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes (Harris et al., 2008). Pathognomonisch ist die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, die zu einer Überexpression des anti-apoptotischen BCL-2 führt (Herold, 2013a). Wichtig ist die histologische Einteilung nach WHO („Grading“) in die Grade 1, 2, 3a und 3b anhand der Anzahl von Zentroblasten pro mikroskopischem Gesichtsfeld und dem histologischen Wachstumsmuster (diffus oder folliculär). Dabei sind die Grade 1 und 2 als niedrigmalignes Lymphom einzustufen während ab Grad 3a, der durch mindestens 15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld und ein überwiegend diffuses Wachstumsmuster gekennzeichnet ist, das biologische Verhalten eher einem DLBL und somit einem hochmalignen Lymphom ähnelt. Die Trennung zwischen Grad 3a und 3b erfolgt abhängig davon, ob noch Zentrozyten vorkommen oder solide Rasen von Zentroblasten vorliegen (Harris et al., 2008).

Diese Einteilung wurde in dieser Arbeit berücksichtigt, demnach wurden die folliculären Lymphome der Gruppe 1 & 2 als einzelne Entität betrachtet zusammengefasst und den niedrigmalignen Lymphomen zugeordnet, während die Gruppen 3a und 3b dagegen als separate Gruppe den hochmalignen Lymphomen zugeteilt wurden.

Differenzialdiagnostisch müssen entzündliche Veränderungen und andere maligne Lymphome in Betracht gezogen werden; aus dem oben beschriebenen Stellenwert der mikroskopischen Untersuchung ergibt sich die Notwendigkeit einer Lymphknotenexstirpation mit anschließenden immunhistochemischen Färbungen. So sind typische B-Zell Marker nachweisbar, darunter CD19, CD20, CD22 und CD79a; CD5 ist dagegen negativ (Harris et al., 2008).

Die histologische Einteilung darf nicht mit dem klinischen Stadium nach Ann-Arbor verwechselt werden (Stadium I-IV), das für verschiedene Lymphome jeweils leicht angepasst und auch für das folliculäre Lymphom Anwendung findet. Die Ann-Arbor Einteilung macht eine Aussage über die Ausbreitung der Krankheit in verschiedenen Lymphknotenstationen und extranodalen Organen sowie die Anwesenheit oder Abwesenheit der typischen Begleitsymptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) und ist entscheidend für die Therapieplanung (Herold, 2013a). Es ist also möglich, dass ein folliculäres Lymphom Grad 1 ein klinisches Stadium III aufweist und umgekehrt auch, dass ein folliculäres Lymphom Grad 3a sich im klinischen Stadium I befindet. Allerdings werden die meisten folliculären Lymphome in fortgeschrittenen klinischen Stadien diagnostiziert (Herold, 2013a).

Mantelzelllymphom

Das Mantelzelllymphom ist ein Lymphom mit histologisch variabler Morphologie, das immunhistochemisch CD5 positiv, aber CD10 und CD23 negativ ist. Pathognomonisch ist die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die zu einer veränderten Expression des Cyclin D1 führt, einem Zellzyklusregulator. Es kommt im Gegensatz zu anderen B-NHL häufiger bei Männern vor (Swerdlow et al., 2008). Die Langzeitprognose ist innerhalb der niedrigmalignen Lymphome ungünstig; es zeigt sich häufig eine Knochenmarkinfiltration (bis zu 90 % der Patienten) mit Beeinträchtigung der Hämatopoese. In dieser Arbeit wurde es den niedrigmalignen B-NHL zugeordnet, obwohl es häufig klinisch den Verlauf eines aggressiven B-NHL zeigt (Dreyling et al., 2012).

1.4.8.2 Hochmaligne B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)

Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBL)

Dieses hochmaligne B-Zell-Lymphom ist das häufigste B-NHL überhaupt und kann in jedem Alter primär oder auch sekundär auftreten, z.B. nach CLL (Richter-Syndrom). Histologisch finden sich reife maligne Zellen mit großen Kernen in diffusen Wachstumsmustern, das Bild ist aber nicht einheitlich und eine genaue Diagnose sollte durch einen Referenzpathologen erfolgen (Dührsen et al., 2013). Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man gemäß WHO Subtypen und Varianten, darunter anhand morphologischer Kriterien z.B. zentroblastische, immunoblastische und anaplastische DLBL (Stein et al., 2008). Eine Subgruppenbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen, um eine bessere Übersichtlichkeit zu wahren. Die B-Zell Zugehörigkeit kann immunphänotypisch nachgewiesen werden und dient der Abgrenzung gegenüber anderen großzelligen Lymphomen wie dem ALCL.

Teilweise können genetische Aberrationen nachgewiesen werden, darunter häufig BCL2- und BCL6-Translokationen oder auch Myc-Translokationen, die eine schlechtere Prognose implizieren (Dührsen et al., 2012). Es gibt neben diesen genetischen noch viele weitere prognostische Faktoren, z.B. das Alter oder hohe Spiegel an Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum (Stein et al., 2008). Die Therapieintention unter Anwendung von Polychemotherapie ist kurativ einzustufen, sofern Komorbiditäten nicht therapielimitierend sind. Wichtigste Differenzialdiagnosen sind andere hochmaligne B-Zell Lymphome wie z.B. Hodgkin- und Burkitt Lymphome, die anders therapiert werden sollten (Dührsen et al., 2012).

Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom ist in seiner Biologie als besonders maligne anzusehen, da es sich durch eine sehr hohe Teilungsaktivität auszeichnet. In Mitteleuropa überwiegen spärliche sporadische Fälle in verschiedenen Altersgruppen, in Afrika tritt dagegen das Burkitt Lymphom endemisch sehr viel häufiger auf, vor allem bei Kindern; eine Assoziation mit Malaria und dem Epstein-Barr-Virus ist beschrieben (Leoncini et al., 2008).

In der Histologie finden sich neben den monomorphen mittelgroßen Blasten, die fast alle im proliferativen Zustand vorliegen, eingestreute Makrophagen, die apoptotische Tumorzellen abräumen. Über eine Knochenmarkbiopsie sollte die Frage nach einer gleichzeitigen ALL, abhängig vom Grad der Infiltration, geklärt werden. Häufig kann die Translokation t(8;14)(q24;q32) nachgewiesen werden, die zu einer Überexpression von Myc führt. Andere Translokationen wie t(8;22)(q24;q11) oder t(2;8)(p11;q24) kommen aber ebenfalls vor und nur die Zusammenschau aus Genetik, Morphologie und Immunphänotyp kann eine Diagnose begründen. Die Proliferationsaktivität der Blasten wird mittels Ki-67-Antikörperfärbung überprüft und ist i.d.R. fast 100 % (Leoncini et al., 2008).

1.4.9 Reife T-Zell-/NK-Zell-Lymphome

Die Non-Hodgkin-Lymphome der T-Zell/NK-Zell-Reihe sind mit 10-15 % aller NHL deutlich seltener als die der B-Zell Reihe, dies bereitet Probleme bei Diagnostik und Therapie, da es deutlich weniger Patienten zur Durchführung randomisierter Studien gibt. Hier werden lediglich die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Entitäten erwähnt, welche ganz überwiegend nodale Manifestationen waren, siehe Tabelle 9. Andere Krankheitsgruppen, die hier nicht untersucht wurden, sind kutane T-Zell Lymphome, darunter das Sézary Syndrom, die Mycosis fungoides und das primär kutane ALCL. Des Weiteren extranodale T-Zell Lymphome wie das T-Zell Lymphom vom nasalen Typ und das hepatosplenische T-Zell Lymphom. Außerdem wurden auch leukämisch verlaufende T-Zell Neoplasien wie beispielweise die T-Zell Prolymphozytenleukämie nicht untersucht (Jaffe et al., 2008).

1.4.9.1 Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AITL)

Das AITL ist insgesamt eine seltene oligoklonale T-Zell Erkrankung, die jedoch mit einem Anteil von 15-20 % aller T-NHL hiervon eine häufigere Form darstellt und eher bei älteren Patienten ab 60 Jahren auftritt (Armitage, 2013). Ihr Charakter im biologischen Sinne ist als hochmaligne einzustufen, unbehandelt versterben die Patienten rasch und

auch unter Behandlung ist die 5-Jahres-Überlebensrate nur zwischen 10-30 % (Iannitto et al., 2008). Neben den eher kleinen entarteten T-Zellen, die gemäß einem T-Helferzell-Profil meist CD3, CD4 und CD10 exprimieren, und einem vorherrschenden reaktiven Lymphknotenstroma aus Plasmazellen und Makrophagen kommt typischerweise eine Proliferation von Hochendothelialen Venolen (HEV) und eine Vermehrung von follikulären dendritischen Zellen (FDC) vor. Anhand der vorherrschenden Lymphfollikelarchitektur unterscheidet man weitere Subtypen (Dogan et al., 2008).

1.4.9.2 Anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL)

Dies ist eine heterogene Entität innerhalb der peripheren T-Zell Lymphome, die sich durch pleomorphe, große Zellen und durch Expression des CD30 Antigens auszeichnet. Im Gegensatz zu Hodgkin Zellen, die ebenfalls CD30 exprimieren, kann durch typische T-Zell Marker die zelluläre Abstammung gezeigt werden; des Weiteren findet sich in den meisten Fällen eine Monoklonalität des T-Zell-Rezeptors (Armitage, 2013). Daneben spielt in der Unterscheidung zwischen den beiden Entitäten das Begleitstroma und die sogenannten „Hallmark Cells“, die bei allen Subtypen des ALCL auftreten, eine Rolle (Delsol et al., 2008). Häufig findet sich die Translokation t(2;5)(p23;q35), die zu einer Überexpression der ALK-Tyrosinkinase (Anaplastic lymphoma kinase) führt, welche auch immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Es kann in Einzelfällen diagnostisch schwierig sein, andere großzellige Lymphome oder auch Metastasen anderer Tumoren abzugrenzen. Die Patienten mit ALK-positiven ALCL sind meist deutlich jünger als die Patienten, die an anderen peripheren T-Zell Lymphomen erkranken, und die Prognose ist als deutlich besser einzustufen (Rodriguez et al., 2009). Die WHO Klassifikation unterscheidet ALK-positive von ALK-negativen ALCL; aufgrund der geringen Fallzahl wurde diese Trennung innerhalb dieser Arbeit nicht vorgenommen.

1.4.9.3 Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert (PTCL, NOS)

Dies ist eine an sich heterogene Gruppe aus verschiedenen T-Zell Lymphomen hoher biologischer Aggressivität, die von reifzelligen Lymphozyten der T-/NK-Zell-Reihe

abstammen und meist bei älteren Patienten ab 60 Jahren vorkommen (Rodriguez et al., 2009). Im Gegensatz zu B-Zell Lymphomen wurde für T-NHL abseits der ALCL-typischen $t(2;5)(p23;q35)$ Translokation bisher keine Subklassifikation anhand spezifischer genetischer Aberrationen vorgenommen, somit ist die Einteilung PTCL, NOS vermutlich unpräzise (Armitage, 2013) und könnte bei der nächsten Revision der WHO Klassifikation spezifiziert werden. In die Gruppe PTCL, NOS fallen also periphere T-Zell Lymphome, die ALK negativ sind und auch die immunphänotypischen und morphologischen Kriterien anderer fest definierter Gruppen nicht abbilden. Diese Lymphome sind als hochmaligne einzustufen. Das Therapieansprechen und somit auch die Prognose ist in den meisten Fällen schlecht (Pileri et al., 2008).

1.4.10 Hodgkin Lymphom

Die Gruppe der Hodgkin Lymphome ist unter allen lymphatischen Neoplasien relativ häufig und aufgrund der speziellen Eigenschaften trotz B-Zell Abstammung als eigene Krankheitsentität erfasst. Das Auftreten des häufigeren klassischen Hodgkin Lymphoms häuft sich um das 30. und um das 60. Lebensjahr, besitzt also zwei Krankheitsgipfel (Herold, 2013a). Im Falle dieser Entität sind mikroskopisch spezielle ein- (Hodgkin-Zellen) oder mehrkernige Zellen (Sternberg-Reed-Zellen) nachweisbar, die pathognomonisch CD15 und CD30 positiv sind. Diese Tumorzellen leiten sich von B-Lymphozyten des Keimzentrums ab, wobei ein ausgeprägtes Begleitstroma reaktiver Zellen typisch ist und meist nur ca. 1 % Tumorzellen vorliegen (Stein, 2008). Anhand des histologischen Bildes unterscheidet man verschiedene Subtypen des klassischen Hodgkin Lymphoms, die obligat vor Therapiebeginn festzulegen sind (Herold, 2013a).

Tab. 4: Histologische Typen des Hodgkin Lymphoms

Das klassische Hodgkin Lymphom ist durch Expression der Oberflächenmarker CD15 und CD30 gekennzeichnet, das NLPHL dagegen durch Expression von CD20 und CD79a. Die verschiedenen Subtypen sind unterschiedlich häufig und werden anhand histologischer Kriterien obligat vor Therapiebeginn bestimmt; statistische Häufigkeiten gemäß: (Herold, 2013). Hodgkin Lymphome sind sehr häufig einer kurativen Polychemotherapie zugänglich, das NLPHL hat die beste Prognose. In dieser Arbeit wurden keine Fälle der seltenen Gruppe der lymphozytenarmen klassischen HL untersucht.

| | |
|---|--|
| Klassisches Hodgkin Lymphom CD 15+, CD30+ | 93 %, davon 60 % nodulär sklerosierend 28 % Mischtyp 5 % lymphozytenreich 0,3 % lymphozytenarm |
| Noduläres lymphozytenprädominantes HL CD 20+, CD79a+ | 7 % |

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Subgruppierung anhand der histologischen Typen vorgenommen, da die Fallzahl höher war als bei den T-NHL. Es unterscheiden sich die einzelnen Gruppen des klassischen Hodgkin Lymphoms anhand ihres Wachstumsmusters, der vorliegenden Fibrose und des Begleitstromas, sie unterscheiden sich aber nicht bezüglich ihres Immunphänotyps, der das entscheidende Unterscheidungskriterium zum NLPHL darstellt (Stein, 2008), siehe Tabelle 4. Abhängig von klinischer Ausdehnung und prognostischen Faktoren wird unter Einsatz von Zytostatika und/oder Bestrahlung behandelt, wobei die Prognose innerhalb onkologischer Erkrankungen des Erwachsenenalters sehr gut ist (Fuchs et al., 2012). Das NLPHL weist dabei die beste Prognose innerhalb der Hodgkin Lymphom Gruppe auf (Herold, 2013a).

2. Methoden

Diese Studie wurde auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes aus dem Jahre 1983 und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt und von der zuständigen Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Projektnummer 045-12).

2.1 Studienkollektiv

2.1.1 Knochenmarkstanzbiopsien

Zur Untersuchung von Knochenmarkbiopsien auf LSD1 Expression in hämatologischen Erkrankungen wurden retrospektiv Fälle aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert. Diese wurden mittels Metasuche im hausinternen Archivierungsprogramm „Patho-Pro“ gesichtet und anhand der Diagnosekriterien, die weiter unten beschrieben sind, für immunhistochemische Untersuchungen selektiert. Dabei musste auch beachtet werden, ob qualitativ hochwertiges Material in ausreichender Menge zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen vorlag und ob vollständige Daten zur Einordnung gemäß der aktuellen WHO-Klassifizierung vorlagen, da die Fälle teilweise nach älteren Klassifikationen diagnostiziert worden waren. Insgesamt konnten 197 Fälle aus den Jahren 2002 bis 2014 gemäß zuvor beschriebener Systematik diagnostiziert und daraufhin auf LSD1 Expression untersucht werden. Die Zusammensetzung des Patientenkollektivs kann Tabelle 5 entnommen werden.

Tab. 5: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der Knochenmarkstanzbiopsien, getrennt nach Geschlecht

Die Gruppen waren gemäß der unterschiedlichen Inzidenzen der Erkrankungen nicht gleich groß, entsprechen aber in ihrem Altersprofil und dem Geschlechterverhältnis größtenteils den statistisch zu erwartenden Verteilungen. Ungewöhnlich junge oder alte Patienten wurden nicht ausgeschlossen, z.B. junge MDS Patienten, siehe Spalte „R“. Insgesamt waren 115 Patienten männlich (58,4%) und 82 Patienten weiblich (41,6%). Abkürzungen: n: Anzahl; w: weiblich; (%): Prozentualer Anteil des jeweiligen Geschlechts an der Gesamtzahl der Diagnosegruppe; Mw: Mittelwert des Patientenalters; SD: Standardabweichung des Mittelwertes; M: Median des Patientenalters; R: jeweils jüngster und ältester Patient der Gruppe.

| | n | w | (%) | Mw | (SD) | M | R | m | (%) | Mw | (SD) | M | R |
|------------------------|----|----|--------|------|--------|------|---------|----|---------|------|--------|------|---------|
| Normal | 15 | 8 | (53,3) | 53,8 | (15,1) | 53 | (34-75) | 7 | (46,7) | 44,9 | (21,7) | 37 | (22-76) |
| Reaktiv | 27 | 8 | (29,6) | 61,6 | (11,1) | 61,5 | (41-78) | 19 | (70,4) | 61,6 | (17,8) | 66 | (29-87) |
| CML | 19 | 9 | (47,4) | 62,0 | (12,3) | 57 | (43-78) | 10 | (52,6) | 61,3 | (10,8) | 65,5 | (42-78) |
| PV | 9 | 4 | (44,4) | 58,0 | (11,9) | 60 | (42-70) | 5 | (55,6) | 61,8 | (13,6) | 67 | (47-77) |
| PMF | 31 | 16 | (51,6) | 68,0 | (15,5) | 74 | (23-82) | 15 | (48,4) | 62,2 | (13,2) | 63 | (41-82) |
| ET | 12 | 7 | (58,3) | 67,4 | (14,4) | 72 | (48-81) | 5 | (41,7) | 69,2 | (7,5) | 73 | (57-75) |
| CMML | 10 | 3 | (30,0) | 70,7 | (1,2) | 70 | (70-72) | 7 | (70,0) | 68,9 | (8,4) | 69 | (58-79) |
| MDS | 16 | 4 | (25,0) | 60,8 | (22,9) | 66,5 | (29-81) | 12 | (75,0) | 68,8 | (9,0) | 69,5 | (53-82) |
| AML mit rek. gen. Abn. | 7 | 4 | (57,1) | 55,7 | (6,5) | 56 | (49-62) | 3 | (42,9) | 48,7 | (18,6) | 51 | (29-66) |
| AML, MDS assoziiert | 18 | 6 | (33,3) | 65,5 | (13,0) | 64 | (46-83) | 12 | (66,7) | 71,1 | (6,4) | 69 | (62-87) |
| AML, NOS | 13 | 9 | (69,2) | 64,3 | (12,4) | 67 | (48-79) | 4 | (30,8) | 63,5 | (17,3) | 61,5 | (48-83) |
| Blastenkrise bei MPN | 7 | 2 | (28,6) | 71,0 | (4,2) | 71 | (68-74) | 5 | (71,4) | 68,0 | (6,0) | 66 | (63-78) |
| B-ALL | 11 | 2 | (18,2) | 27,5 | (12,0) | 27,5 | (19-36) | 9 | (81,8) | 60,7 | (15,2) | 64 | (38-80) |
| T-ALL | 2 | 0 | (0,0) | - | - | - | - | 2 | (100,0) | 47,0 | (26,9) | 47 | (28-66) |

Die Daten wurden in einer fortlaufenden Excel Tabelle pseudonymisiert erfasst; es wurden die überarbeiteten Diagnosen und Diagnosegruppen nach WHO (1-12), die LSD1 Expression getrennt nach Myelopoese, Erythropoese und Megakaryopoese sowie falls vorhanden Blasten, das Blutbild getrennt nach Leukozytenzahl, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl, das Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Biopsie sowie weiterführende Diagnostik wie Immunhistochemie und Molekulargenetik festgehalten.

Wichtig zu erwähnen ist, dass auch Knochenmarkbiopsien von Patienten ohne neoplastische Infiltration ins Knochenmark in die Untersuchung einbezogen wurden, um einen Vergleich zu nichtneoplastischer Hämatopoese zu ermöglichen. Da kein gesundes Kontrollkollektiv zur Verfügung stand, wurden Knochenmarkbiopsien herangezogen, die im Rahmen der diagnostischen Abklärung verschiedener Erkrankungen indiziert waren.

In Frage kamen dabei zum Beispiel die Fragestellung „unklare Anämie“ oder der Ausschluss systemischer Mastozytosen, des Weiteren Staging-Untersuchungen im Rahmen anderer maligner Erkrankungen und Biopsien im Rahmen der Nachsorge hämatologischer Erkrankungen.

Es wurde eine Einteilung dieser Fälle in „normal“ und „reaktiv“ vorgenommen. Die Kriterien der Gruppe „normal“ bestanden in regelrecht ausdifferenzierender Hämatopoese aller Zellreihen bei gleichzeitig normalen Zellzahlen des peripheren Blutes gemäß folgender Referenzwerte: (1) Frauen: Leukozyten: 4.700-11.000 / μ l, Hämoglobin: 12,0-16,0 g / dl, Thrombozyten: 140.000-400.000 / μ l; (2) Männer: Leukozyten 4.700-11.000 / μ l, Hämoglobin: 14,0-18,0 g / dl, Thrombozyten: 140.000-400.000 / μ l. Als „reaktiv“ wurde dagegen jegliche nicht-maligne Veränderung der Hämatopoese im Knochenmark oder Veränderungen der Zahlen der peripheren Blutzellen gewertet, sei es eine Abweichung nach oben oder unten. Patienten, die in der Vorgeschichte Chemotherapie oder Bestrahlung erhalten hatten, wurden grundsätzlich als „reaktiv“ eingestuft, unabhängig von aktuellen Blutwerten.

Die Zusammensetzung der Gruppen „normal“ und „reaktiv“ kann Tabelle 6 entnommen werden.

Tab. 6: Zusammensetzung des Patientenkollektivs „reaktive“ und „normale“ Knochenmarkbiopsien, getrennt nach Geschlecht

Die heterogenen Gruppen „normal“ und „reaktiv“ wurden aus Patienten gebildet, von denen aus unterschiedlichen Gründen Material einer Knochenmarkstanzbiopsie vorlag, bei denen aber keine maligne hämatologische Erkrankung gefunden wurde. Kriterien für die Gruppe „normal“ war ein normales peripheres Blutbild und eine regelrecht differenzierende Hämatopoese aller Zellreihen im Knochenmark. „Malignomausschluss“ bedeutet in diesem Zusammenhang eine Untersuchung aufgrund des klinischen Verdachts auf eine maligne Erkrankung, „Staging“ dagegen die Ausbreitungsdiagnostik bei malignem Geschehen außerhalb des Knochenmarks. „Unklare Zytopenie“ entspricht der diagnostischen Abklärung von verminderten Zellzahlen ohne konkreten Malignomverdacht und „Nachsorge“ umfasst Patienten in kompletter Remission, die in der Vergangenheit Chemotherapie oder Strahlentherapie aufgrund verschiedener Erkrankungen erhielten.

Abkürzungen: n: Anzahl; w: weiblich; (%): Prozentualer Anteil des jeweiligen Geschlechts an der Gesamtzahl der Diagnosegruppe; Mw: Mittelwert des Alters; SD: Standardabweichung des Alters; M: Median des Alters; R: jeweils jüngster und ältester Patient der Gruppe.

| | | n | w | (%) | Mw | (SD) | M | R | m | (%) | Mw | (SD) | M | R |
|---------|--------------------------------|----|---|---------|------|--------|------|---------|---|---------|------|--------|------|---------|
| normal | Malignom-ausschluss | 1 | 1 | (100,0) | 70,0 | - | 70 | (70-70) | 0 | (0,0) | - | - | - | - |
| | Staging | 12 | 5 | (41,7) | 55,4 | (15,8) | 60 | (34-75) | 7 | (58,3) | 44,9 | (21,7) | 37 | (22-76) |
| | Ausschluss syst. Mastozytose | 2 | 2 | (100,0) | 41,5 | (4,9) | 41,5 | (38-45) | 0 | (0,0) | - | - | - | - |
| reaktiv | Malignom-ausschluss | 6 | 2 | (33,3) | 57,5 | (4,9) | 57,5 | (54-61) | 4 | (66,7) | 52,5 | (22,5) | 52,5 | (29-76) |
| | Staging | 6 | 1 | (16,7) | 41,0 | - | 41 | (41-41) | 5 | (83,3) | 71,8 | (10,7) | 71 | (56-84) |
| | unklare Zytopenie | 5 | 1 | (20,0) | 72,0 | - | 72 | (72-72) | 4 | (80,0) | 69,3 | (9,4) | 66 | (62-83) |
| | Nachsorge, Z.n. Chemo/Radiatio | 8 | 4 | (50,0) | 66,3 | (7,9) | 63 | (61-78) | 4 | (50,0) | 50,0 | (14,7) | 54,5 | (29-62) |
| | Sonstiges | 2 | 0 | (0,0) | - | - | - | - | 2 | (100,0) | 62,5 | (34,6) | 62,5 | (38-87) |

2.1.2 Lymphatisches Gewebe

Die Zusammenstellung des Tissue Micro Array (TMA) lymphatischer Neoplasien erfolgte nach Durchsicht der Datenbank des Instituts für Pathologie wie in Khristi et al., 2013 beschrieben; für weitere Aspekte siehe Kapitel 2.3: „Tissue Micro Array Analyse“. Die Sicherung der Diagnosen gemäß WHO Klassifizierung war zuvor an Standardschnitten

von in Formalin fixierten, in Paraffin eingebetteten Lymphknoten durchgeführt worden. Eine fortlaufende, pseudonomysierte Excel Tabelle dieser Fälle wurde durch den Autor von Jennifer Khristi übernommen, überprüft und weiter gepflegt. Einige Fälle aus dem Lymphom-TMA konnten keiner Diagnose nach WHO-Kriterien klar zugeordnet werden und wurden konsekutiv in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, z.B. weil nicht genug Material für die Wiederholung einer molekulargenetischen Untersuchung vorlag oder klinische Daten nicht verfügbar waren. Einige Fälle waren in der immunhistochemischen LSD1-Färbung nicht repräsentativ erfasst und konnten somit ebenfalls nicht gewertet werden. Insgesamt konnten 354 Fälle lymphatischer Neoplasien aus den Jahren 1992 bis 2012 untersucht werden, die Zusammensetzung des Patientenkollektivs kann den Tabellen 7 und 8 entnommen werden.

Tab. 7: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Geschlecht und Diagnosegruppen

Gemäß statistisch zu erwartender Häufigkeiten konnten v.a. B-Zell Neoplasien untersucht werden, darunter jeweils über 100 Fälle niedrigmaligner und hochmaligner B-NHL. Des Weiteren wurden 55 Fälle von Hodgkin Lymphomen und 21 Fälle von T-NHL untersucht. Für eine genauere Aufgliederung der Diagnosegruppen, siehe Tabelle 8. Abkürzungen: siehe Legende Tabelle 8.

| | n | w | (%) | Mw | (SD) | M | R | m | (%) | Mw | (SD) | M | R |
|----------------------|-----|----|--------|------|--------|----|---------|----|--------|------|--------|------|---------|
| Niedrigmaligne B-NHL | 147 | 59 | (40,1) | 64,5 | (11,6) | 62 | (39-88) | 88 | (59,9) | 64,3 | (11,3) | 65 | (31-85) |
| Hochmaligne B-NHL | 131 | 65 | (49,6) | 63,4 | (18,0) | 66 | (16-92) | 66 | (50,4) | 59,5 | (17,8) | 63 | (9-85) |
| T-NHL | 21 | 11 | (52,4) | 69,2 | (15,7) | 74 | (39-88) | 10 | (47,6) | 57,4 | (21,7) | 62 | (21-80) |
| Hodgkin Lymphome | 55 | 31 | (56,4) | 36,2 | (21,4) | 26 | (10-88) | 24 | (43,6) | 37,5 | (17,9) | 34,5 | (15-69) |

Tab. 8: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Geschlecht und Diagnose

Die am meisten untersuchten Entitäten waren die häufig vorkommenden DLBL (102 Fälle), folliculäre Lymphome der niedrigen histologischen Grade 1 & 2 (57 Fälle), CLL (36 Fälle) und nodulär sklerosierende Formen von Hodgkin Lymphomen (36 Fälle). Wenige Fälle lagen dagegen von den verschiedenen T-NHL (ALCL: 6 Fälle, PTCL, NOS: 7 Fälle und AITL: 8 Fälle) und von NLPHL (4 Fälle) vor. Die Alterszusammensetzung und die Altersmittelwerte zeigen, dass die Erkrankungen häufiger im höheren Alter auftreten, vor allem die aggressiven Lymphome werden aber auch bei jüngeren Patienten beobachtet.

Abkürzungen für Tabelle 7 und 8: n: Anzahl; w: weiblich; (%): Prozentualer Anteil des jeweiligen Geschlechts an der Gesamtzahl der Diagnosegruppe; Mw: Mittelwert des Alters; SD: Standardabweichung des Alters; M: Median des Alters; R: jeweils jüngster und ältester Patient der Gruppe.

| | n | w | (%) | Mw | (SD) | M | R | m | (%) | Mw | (SD) | M | R |
|-------------------------------------|-----|----|--------|------|--------|----|---------|----|--------|------|--------|------|---------|
| CLL / SLL | 36 | 12 | (33,3) | 68,8 | (10,6) | 67 | (51-88) | 24 | (66,7) | 65,8 | (10,7) | 64 | (45-84) |
| Marginalzonen Lymphom | 21 | 10 | (47,6) | 64,7 | (12,8) | 63 | (48-87) | 11 | (52,4) | 63,8 | (13,1) | 67 | (34-78) |
| Follikuläres Lymphom 1 & 2 | 57 | 29 | (50,9) | 62,1 | (12,3) | 59 | (39-87) | 28 | (49,1) | 59,0 | (11,3) | 58,5 | (31-78) |
| Mantelzell Lymphom | 33 | 8 | (24,2) | 66,3 | (8,5) | 70 | (51-75) | 25 | (75,8) | 68,9 | (8,9) | 69 | (47-85) |
| Follikuläres Lymphom 3a & 3b | 20 | 14 | (70,0) | 57,4 | (19,1) | 61 | (20-91) | 6 | (30,0) | 65,0 | (7,9) | 68 | (52-73) |
| DLBL , NOS | 102 | 48 | (47,1) | 63,9 | (17,4) | 68 | (16-92) | 54 | (52,9) | 60,6 | (17,2) | 63 | (21-85) |
| Burkitt Lymphom | 9 | 3 | (33,3) | 81,7 | (8,3) | 79 | (75-91) | 6 | (66,7) | 44,2 | (24,9) | 52,5 | (9-68) |
| AITL | 8 | 4 | (50,0) | 74,3 | (2,4) | 75 | (71-76) | 4 | (50,0) | 59,0 | (16,0) | 59,5 | (40-77) |
| ALCL | 6 | 2 | (33,3) | 39,5 | (0,7) | 40 | (39-40) | 4 | (66,7) | 46,5 | (27,6) | 42,5 | (21-80) |
| PTCL, NOS | 7 | 5 | (71,4) | 77,0 | (8,1) | 76 | (68-88) | 2 | (28,6) | 76,0 | (2,8) | 76 | (74-78) |
| Nodulär sklerosierend | 36 | 21 | (58,3) | 31,8 | (17,9) | 24 | (14-76) | 15 | (41,7) | 38,7 | (20,4) | 40 | (16-69) |
| Mischtyp | 10 | 5 | (50,0) | 26,8 | (17,9) | 23 | (10-57) | 5 | (50,0) | 36,8 | (9,6) | 37 | (26-52) |
| Lymphozytenreich / - prädominant | 5 | 4 | (80,0) | 65,5 | (20,6) | 66 | (43-88) | 1 | (20,0) | 15,0 | - | 15 | (15-15) |
| NLPHL | 4 | 1 | (25,0) | 58,0 | - | 58 | (58-58) | 3 | (75,0) | 40,3 | (17,9) | 31 | (29-61) |

Die Daten wurden in einer separaten fortlaufenden Excel Tabelle getrennt nach nodalen und extranodalen Biopsien erfasst. Es wurden die überarbeiteten Diagnosen, die stärkste LSD1 Expression in mindestens 10 % der Tumorzellen, das Organ der Biopsieentnahme bzw. des entfernten Gewebes, das Geschlecht, das Alter zum Zeitpunkt der Entnahme sowie weiterführende Diagnostik, wie Immunhistochemie und Molekulargenetik, festgehalten.

Tab. 9: Zusammensetzung der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Herkunft des Untersuchungsmaterials

Lymphknoten wurden in diesem Zusammenhang als nodal bezeichnet, andere Gewebe als extranodal. Letztlich wurden fast alle Entitäten häufiger in Lymphknoten untersucht als in extranodalen Geweben. Die Ausnahme bildet hier das Marginalzonenlymphom, über 60% des untersuchten Materials stammte hier nicht aus Lymphknoten sondern aus verschiedenen Organen, z.B. häufig aus lymphatischem Gewebe des Magens.

Abkürzungen: B-NHL / T-NHL: Non-Hodgkin-Lymphom vom B-Zell / T-Zell Typ; CLL / SLL: Chronisch lymphatische Leukämie / kleinzelliges B-Zell Lymphom; DLBL: Diffus Großzelliges B-Zell Lymphom; AITL: Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom; ALCL: Anaplastisches großzelliges Lymphom; PTCL, NOS: Peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifiziert; NLPHL: Lymphozytenprädominantes Hodgkin Lymphom.

| | n | nodal (%) | extranodal (%) |
|------------------------------|-----|------------|----------------|
| niedrigmaligne B-NHL | 147 | 112 (76,2) | 35 (23,8) |
| CLL / SLL | 36 | 32 (88,9) | 4 (11,1) |
| Marginalzonenlymphom | 21 | 8 (38,1) | 13 (61,9) |
| Follikuläres Lymphom 1 & 2 | 57 | 49 (86,0) | 8 (14,0) |
| Mantelzelllymphom | 33 | 23 (69,7) | 10 (30,3) |
| hochmaligne B-NHL | 131 | 104 (79,4) | 27 (20,6) |
| Follikuläres Lymphom 3a & 3b | 20 | 17 (85,0) | 3 (15,0) |
| DLBL | 102 | 79 (77,5) | 23 (22,5) |
| Burkitt Lymphom | 9 | 8 (88,9) | 1 (11,1) |
| T-NHL | 21 | 20 (95,2) | 1 (4,8) |
| AITL | 8 | 8 (100,0) | 0 (0,0) |
| ALCL | 6 | 6 (100,0) | 0 (0,0) |
| PTCL, NOS | 7 | 6 (85,7) | 1 (14,3) |
| Klassisches HL | 51 | 49 (96,1) | 2 (3,9) |
| Nodulär-sklerosierend | 36 | 36 (100,0) | 0 (0,0) |
| Mischtyp | 10 | 8 (80,0) | 2 (20,0) |
| Lymphozytenreich | 5 | 5 (100,0) | 0 (0,0) |
| NLPHL | 4 | 2 (50,0) | 2 (50,0) |

2.2 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung erfolgte auf Grundlage der aktuellen Fassung (4. Auflage) der Klassifikation der Tumoren hämatopoetischer und lymphatischer Gewebe der WHO aus dem Jahr 2008 gemäß der zuvor beschriebenen Einteilung in zwölf Gruppen. Um die Diagnose zweifelsfrei stellen zu können, waren für verschiedene Erkrankungen unterschiedliche Verfahren notwendig, da wie in Kapitel 1.4 beschrieben jeweils diverse

klinische, zyto-/molekulargenetische, immunphänotypische oder morphologische Eigenschaften krankheitsdefinierend sind (Orazi, 2007).

2.2.1 Patho Pro[®]

Zwecks Durchsicht der histologischen und zytologischen Befunde, eventuell vorhandener Referenzbefunde und zwecks Durchführung einer Metasuche zur Identifikation weiterer Patienten, wurde auf das interne Archivierungssystem des Pathologischen Instituts Patho Pro[®] (ifms GmbH, Saarbrücken, Deutschland) zurückgegriffen. Der Autor konnte über einen Studentenzugang auf alle archivierten Befunde des Hauses zugreifen und diese zwecks Informationsgewinnung sichten und auswerten.

2.2.2 ORBIS[®]

Das elektronische Krankenhausinformationssystem *ORBIS*[®] (Version: Sol.-Vers.: 08.04.21.03. 0009400 / DB-Vers.: 08.04.21.31; AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien) wurde zur Aufarbeitung klinischer Informationen wie Laboruntersuchungen (inklusive Blutbildbestimmungen, zytomorphologische Befunde von Blutaussstrichen, Gerinnungsdiagnostik, klinische Chemie), Arztbriefen und Einträgen in die Krankenakten genutzt. Untersuchungen und Befunde werden in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Bonn mit diesem System standardmäßig gespeichert und waren so retrospektiv über die Zugangsberechtigung UKB07119 aus dem Institut für Pathologie abrufbar.

Diese Daten waren für eine adäquate Diagnoseüberprüfung und Klassifizierung vor allem der MPN aber auch der anderen hämatologischen Neoplasien sowie zur Unterscheidung der „normalen“ und „reaktiven“ Knochenmark Fälle unabdingbar. Bestimmte molekulargenetische Untersuchungen wurden des Weiteren nicht im Institut für Pathologie der Universität Bonn durchgeführt, waren aber durch die Aufarbeitung der Arztbriefe für diese Studie verfügbar. Zusätzliche Informationen wurden bei nicht eindeutigen Fällen in Zusammenarbeit mit Dr. med Viktor Janzen aus der Medizinischen

Klinik und Poliklinik III, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, zusammengetragen, sodass die Befunde aus Knochenmarkbiopsie und Zytologie, die in der Pathologie verfügbar waren, auch retrospektiv in den klinischen Kontext eingeordnet werden konnten.

2.2.3 Knochenmarkzytomorphologie

Die Knochenmarkzytologie dient der Beurteilung einzelner Zellen des Knochenmarks, die durch Aspiration gewonnen und auf einem Objektträger nativ ausgestrichen werden und ist eine der Basisuntersuchungen bei Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung. Zur Beurteilung und besseren Differenzierung unter verschiedenen Fragestellungen, wie zum Beispiel der Differenzierung von Blasten, stehen u.a. die unten genannten Methoden zur Verfügung, die auch für Blutaussstriche und teilweise für Stanzbiopsien angewendet werden können (Bruhn et al., 2008; Kreuzer et al., 2014.).

Pappenheim-Färbung:

Differenzierung basophiler, eosinophiler und neutrophiler Strukturen, Übersichtsfärbung, Morphologie

α -Naphthylacetatesterase-Reaktion:

Nachweis monozytär differenzierter Zellen

Eisenfärbung:

Bestimmung des Eisengehalts der Zellen; Ringsideroblasten

Periodsäure-Schiff-(PAS)-Reaktion:

Bestimmung des Glykogengehalts der Zellen, z.B. teilweise grobschollig positiv bei lymphatischen Blasten

Myeloperoxidase-Reaktion (MPO):

Eine positive Reaktion spricht für myeloisch differenzierte Blasten; eine negative Reaktion schließt diese jedoch nicht aus

Nichtspezifische Esterase-Reaktion (NSE):

Eine positive Reaktion spricht bei Vorhandensein von Blasten für einen monozytären Ursprung

Saure Phosphatase:

Eine positive Reaktion spricht für lymphatische Differenzierung

Alkalische Phosphatase:

Verringerung bei CML, Erhöhung bei anderen MPN und entzündlichen Veränderungen

Bestimmte morphologische Phänomene (wie z.B. Auer-Stäbchen als mögliches Merkmal myeloischer Blasten) sind auch heute noch als Hinweise für bestimmte Krankheitsentitäten bzw. deren Subtypen verwendbar.

2.2.4 Knochenmarkhistologie

Die mikroskopische Untersuchung eines Knochenmarkstanzzyinders bietet in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen die Möglichkeit, das Knochenmark bezüglich Zellularität, der Beschaffenheit und Verteilung der einzelnen Zellreihen inklusive verschiedener Vorläuferzellen und des Knochenmarkstromas zu beurteilen, daher ist ihr Wert in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen sehr hoch (Orazi, 2007; Vardiman et al., 2008a). Darüber hinaus kann der Fibrosegrad anhand des European Consensus Scoring System (Einteilung: Marrow fibrosis = MF 0-III) beurteilt werden (Thiele et al., 2005) und es können immunhistochemische Färbungen zu der Fragestellung der Expression bestimmter Proteine und Zelloberflächenmarker angefertigt werden; dies dient also der Immunphänotypisierung. Somit ist es im initialen Staging einer hämatologischen Erkrankung fast immer empfehlenswert, eine Knochenmarkstanzbiopsie zu gewinnen (Kreuzer et al., 2014).

Die Knochenmarkstanzbiopsien wurden im Institut für Pathologie gemäß gebräuchlicher Protokolle in Formalin fixiert, mittels Trichloressigsäure entkalkt, in Paraffin eingebettet und mit den Färbungen in Tabelle 10 gefärbt, siehe auch (Quintanilla-Martinez et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Färbungen wurden aus den pathologischen Befunden im hauseigenen System Patho Pro[®] zusammengetragen und, falls nicht vorhanden, nachträglich angefertigt.

Tab. 10: Standardfärbungen der histologischen Knochenmarkdiagnostik

Die Nutzung dieser verschiedenen Färbetechniken dient jeweils der mikroskopischen Beurteilung verschiedener Eigenschaften des zu untersuchenden Knochenmarks, wie in der Tabelle beschrieben. Abkürzungen: HE: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Tabelle vereinfacht nach (Vardiman et al., 2008a; Quintanilla-Martinez et al., 2012).

| Färbung | Effekt | Aussage |
|-----------------------------------|---|--|
| HE | Basophile Strukturen färben sich blau an, eosinophile rot | Zellmorphologie, Übersicht |
| Giemsa | Kerne färben sich dunkelrot an, Zytoplasma bläulich | Zellmorphologie, Übersicht |
| ASD-Chloracetat-esterase | Myelopoese und Mastzellen färben sich rot an | Beurteilung der verschiedenen Zellreihen der Hämatopoese, Identifizierung von Mastzellen |
| Eisenfärbung | Eisen färbt sich blau an | Bestimmung des Eisengehalts, Identifizierung von Ringsideroblasten |
| Gordon-Sweet | Versilberung retikulärer Fasern | Bestimmung der Fibrosierung des Knochenmarks |
| PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) | Glykogen und andere Kohlenhydrate färben sich rot an | Physiologische Zellen färben sich schwach an mit feiner Granulation, Blasten färben sich u.U. stark an |

Die Knochenmarkstanzbiopsien wurden nach oben beschriebener Aufarbeitung regelhaft auch immunhistochemisch gefärbt. Bei diesem Verfahren werden monoklonale Antikörper verwendet, die zellspezifische Antigene selektiv binden und anschließend über Verwendung eines Farbstoff-gekoppelten zweiten Antikörpers bzw. durch farbgebende Enzymreaktionen dargestellt werden (indirekte Immunhistochemie) (Bruhn et al., 2008).

Diese Befunde wurden ebenfalls aus Patho Pro[®] zusammengetragen und, falls fehlend, nachträglich durchgeführt. Im Folgenden ist eine unvollständige Auflistung von verwendeten immunhistochemischen Färbungen und deren Bedeutung in der Diagnostik dargestellt. Prinzipiell ist an den in Paraffin eingebetteten Knochenmarkszylindern das gesamte Spektrum der Immunhistochemie durchführbar (Quintanilla-Martinez et al.,

2012). Zum besseren Verständnis der Bedeutung dieser Untersuchung ist es erwähnenswert, dass Blutzellen im Laufe ihrer Entwicklung verschiedene Oberflächenmarker teilweise nur temporär exprimieren. Die dauerhafte Expression eines spezifischen Musters dieser Zelloberflächenstrukturen repräsentiert das fixierte Differenzierungsstadium der jeweiligen entarteten Zelle und ermöglicht somit deren genauere Charakterisierung (Bruhn et al., 2008).

| | |
|------------|--|
| CD3: | Marker für T-Lymphozyten |
| CD5: | Marker zur Differenzierung kleinzelliger B-Zell Lymphome |
| CD13: | Marker für myelomonozytische Zellen |
| CD15: | Marker für neutrophile Granulozyten und Sternberg-Reed-Zellen |
| CD20: | Marker für B-Lymphozyten |
| CD30: | Marker für das klassische Hodgkin Lymphom und ALCL |
| CD33: | Marker für myeloische Vorläuferzellen |
| CD34: | Marker für Stammzellen, Blasten |
| CD68: | Marker für Monozyten und Makrophagen |
| CD79a: | Marker für B-Lymphozyten |
| Cyclin D1: | Marker des Mantelzelllymphoms |
| Ki 67: | Marker für Proliferationsaktivität |
| Lysozym: | Marker für Myelopoese |
| MPO: | Marker für Granulozyten und deren Vorstufen |
| Myc: | Onkogen, vor allem in Burkitt-Lymphomen und DLBL überexprimiert |
| TdT: | Marker für Vorläuferzell Lymphome („lymphoblastische Lymphome“), NK-Zellen |

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein immunzytologisches Verfahren. Dabei werden einzelne Blutzellen in einem Automaten mit Hilfe der Messung von Laserlichtstreuung, Änderung des elektrischen Widerstandes und der Konduktivität mittels entsprechender Detektoren anhand ihrer spezifischen Eigenschaften wie Größe, Gewicht, Granularität

und Oberflächenbeschaffenheit unterschieden (Bruhn et al., 2008). Die Vielzahl an Zellen, die in einer einzelnen Untersuchung detektiert werden, wird anschließend grafisch dargestellt und Computer basiert ausgewertet. Dieses Verfahren ist nicht nur Grundlage der automatischen Zellzahlbestimmung, es können auch die einzelnen Zellen unter Verwendung spezieller Farbstoffe und fluoreszenzmarkierter Antikörper anhand ihrer Oberflächenmarker weiter differenziert werden und somit, wie in der Immunhistochemie nach ihrem Immunphänotyp unterschieden werden (Kreuzer et al., 2014). Es ist möglich, spezielle Zellpopulationen, zum Beispiel im Rahmen der Diagnostik leukämischer Krankheiten bzw. klonaler hämatopoetischer Erkrankungen, genauer zu charakterisieren. Abhängig von der vorliegenden Verdachtsdiagnose eignet sich die Immunhistochemie oder die Durchflusszytometrie besser für diesen Zweck (Quintanilla-Martinez et al., 2012). Allerdings ist die Durchflusszytometrie anfällig für präanalytische Variablen, somit sollten auffällige Befunde z.B. bezüglich der Blastenzahl durch ein weiteres Verfahren bestätigt werden (Vardiman et al., 2008a).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind durch ihre hohe Sensitivität von großer Relevanz für die Diagnostik.

2.2.6 Molekularpathologische Verfahren

Da die WHO Klassifikation bei vielen hämatologischen Krankheiten Subgruppen anhand genetischer Aberrationen definiert, ist es regelhaft notwendig, auf diese Veränderungen zu testen, um therapeutische und prognostische Rückschlüsse zu ziehen. Ein Großteil der Nachweise für die Fälle in dieser Arbeit erfolgte im Rahmen der Diagnostik im Institut für Pathologie unter Leitung von PD Dr. rer. nat. Jutta Kirfel. In Zusammenarbeit mit ihr wurden auch fehlende genetische Nachweise retrospektiv erhoben, falls diese zur Diagnosestellung notwendig waren. Dies war in einigen Fällen nicht möglich, sodass einige Fälle nicht eindeutig klassifiziert werden konnten und somit aus der Analyse ausschieden. Formal lässt sich eine Auftrennung in zytogenetische und molekulargenetische Verfahren unterscheiden. Es kamen folgende Untersuchungen zum Einsatz.

2.2.6.1 Zytogenetische Verfahren

Karyotypbestimmung

Die mikroskopische Bestimmung des vollständigen Chromosomensatzes und dessen Bänderung erfolgt an arretierten und gefärbten Metaphasechromosomen. Diese Technik dient vorrangig der vollständigen Untersuchung auf chromosomale Aberrationen, seien es Translokationen oder Aneuploidien und sollte im Rahmen der Erstdiagnose erfolgen (Kreuzer et al., 2014; Vardiman et al., 2008a).

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FiSH)

Dieses Verfahren ermöglicht die Untersuchung von Interphasezellen, was einen Vorteil bei langsam proliferierenden Zellen bietet (Bruhn et al., 2008). Mit der FiSH Untersuchung ist es möglich bei konkretem Verdacht unter Einsatz sogenannter DNA-Sonden, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, einzelne translozierte Loci mit höherer Sensitivität mikroskopisch zu detektieren. Als Material eignet sich, wie auch für molekulargenetische Fragestellungen, neben EDTA-Vollblut und Knochenmarkaspirat auch fixiertes Knochenmarkstanzbiopsie- und Lymphknotengewebe (Quintanilla-Martinez et al., 2012). Häufige Indikationen zur Durchführung einer FiSH und zum Nachweis der entsprechenden Translokationen sind im Folgenden aufgelistet:

| | |
|--|--|
| Mantelzelllymphom: t(11;14)(q13;q32): | Rearrangement der Gene Cyclin D1 und IgH |
| Follikuläres Lymphom: t(14;18)(q32;q21): | Rearrangement der Gene IgH und BCL2 |
| CML: t(9;22)(q34;q11): | Rearrangement der Gene BCR und ABL1 |
| Marginalzonenlymphom: t(11;18)(q21;q21): | Rearrangement der Gene BIRC3 und MALT1 |
| Burkitt Lymphom: t(8;14)(q24;q32): | Rearrangement der Gene c-Myc und IgH |

2.2.6.2 Molekulargenetische Verfahren

Die molekulargenetischen Verfahren dienen dem Nachweis spezifischer Mutationen, die eine Risikostratifizierung in vielen hämatologischen Erkrankungen ermöglicht. Die Nachweise beruhen auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierten Nachweisverfahren, von denen speziell zu nennen sind:

Klonalitätsnachweis

Da viele hämatopoetische Krankheiten aus einer einzigen entdifferenzierten Zelle hervorgehen und somit im Gegensatz zu reaktiven Veränderungen der Hämatopoese ein monoklonales Zellbild aufweisen, ist die Analyse der Klonalität ein wichtiges Verfahren, vor allem zur Analyse der Lymphozytenpopulation. Die Klonalitätsanalyse erfolgt jeweils für die B- und T-Zell Reihe PCR-basiert mit anschließender geeigneter Nachweismethode. Wichtig ist die klinische Differenzierung, ob eine Monoklonalität pathologischen Wert besitzt, da, vor allem bei älteren Patienten Zustände vorkommen, bei denen dies nicht der Fall ist, wie etwa die monoklonale B-Zell Lymphozytose (Quintanilla-Martinez et al., 2012).

Mutationsanalyse

Der spezifische Nachweis von Mutationen erfolgt nach PCR durch Sequenzierungsmethoden. Wie oben bereits erwähnt, sind bestimmte Mutationen von herausragender prognostischer Bedeutung oder sogar krankheitsdefinierend. Erkrankungen bei denen im Rahmen der Erstdiagnostik bestimmte Gene untersucht werden, sind vor allem verschiedene Leukämien, MPN und MDS (Vardiman et al., 2008a).

2.3 Tissue Micro Array Analyse

Die Technik der Erstellung eines Tissue Micro Arrays (TMA) ist eine ökonomische und gewebeschonende Methode, um eine große Zahl von histologischen Präparaten mit geringerem Arbeitsaufwand untersuchen zu können. Es wurde lymphatisches Gewebe anhand der Standardschnitte diagnostiziert, nachdem dieses mit gebräuchlichen

histologischen Techniken wie Formalinfixierung, Einbettung und Färbungen bearbeitet wurde (Loo und Siddiqi, 2014). Anschließend wurden repräsentative Bereiche an Tumorgewebe markiert und mittels Stanze aus dem ursprünglichem Gewebekblock in einen neuen Paraffinblock eingebettet. Es können bis zu 128 Stanzen in einen einzelnen Block verbracht werden, wobei im Regelfall drei Stanzen eines einzelnen Patienten nebeneinander platziert wurden. Zur Beurteilung der LSD1 Immunhistochemie wurden stets alle drei Stanzen betrachtet und die Stanze mit der besten Beurteilbarkeit zur Klassifizierung herangezogen. Für eine detaillierte Beschreibung der Anfertigung eines TMAs, siehe (Pilla et al., 2012).

Das Lymphom Array, das der Autor zur Auswertung in dieser Arbeit von Jennifer Khristi übernahm, wurde von Frau Seher Aktekin im Institut für Pathologie der Uniklinik Bonn angefertigt.

2.4 LSD1-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Bonn unter Leitung von Frau Susanne Steiner mit einem monoklonalen murinen Antikörper (mAB) gegen LSD1 (cat. no. 100-1762; Novus Biologicals, Littleton, CO, Vorbehandlung Zitratpuffer pH6) und einem automatischen immunhistochemischen Stainer (DAKO Cytomation, Glostrup Denmark) unter Verwendung der Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplex Technik, gemäß Anleitung des Herstellers (DAKO).

Die Verdünnung wurde für die Knochenmarkbiopsien mit 1:500 gewählt; für die Lymphknoten-TMAs wurde die Verdünnung mit 1:2.000 gewählt, da eine vorherige Entkalkung entfiel.

2.5 Scoring

Die Beurteilung der Intensität der LSD1-Expression in den immunhistochemischen Schnitten erfolgte durch den Autor in Zusammenarbeit mit der Leiterin der Abteilung für Zyto- und Hämatopathologie des Instituts für Pathologie der Universität Bonn, PD Dr. med. Ines Gütgemann anhand eines einheitlichen Punktsystems von 0-3. Dabei wurde durchgehend folgender Schlüssel verwendet:

X: nicht beurteilbar

0: keine Expression

1: schwache Expression

2: moderate Expression

3: starke Expression

In den Knochenmarkbiopsien wurden jeweils die Zelllinien Erythropoese, Myelopoese und Megakaryopoese sowie, falls vorhanden, Blasten getrennt beurteilt. Bei der Beurteilung lymphatischen Gewebes wurden lediglich maligne Zellen beurteilt. Die jeweils stärkste Expression in einer oder mehreren Zelllinien oder Blasten wurde in Knochenmarkbiopsien als Grundlage für die Beurteilung angenommen. In lymphatischen Geweben erhielt ein Fall jeweils den höchsten Punktwert für die Expression, die in mindestens 10 % der malignen Zellen in der Stanze mit bester Beurteilbarkeit darstellbar war.

Für die grafische Auswertung (siehe Abbildungen 5 und 7) wurde der Schlüssel vereinfacht und 0-1 als negativ (neg) gewertet, 2 als moderat (mod) und 3 als stark.

2.6 Grafische Darstellung

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im Institut für Pathologie unter Verwendung eines Leica DM LB Mikroskopes und einer JVC Digitalkamera KY-F70B angefertigt. Aufnahmesoftware: Diskus (Vers.: 4.30.474, Carl H. Hilgers, Königswinter, Deutschland). Die Bilder sind in ihrem Farbton, Schärfe etc. nicht bearbeitet worden.

Die Synopsen aus HE-Färbung und LSD1-immunhistochemischer Färbung wurden von Frau Siebenhüner aus der Abteilung für Unternehmenskommunikation des Uniklinikums Bonn angefertigt.

Die Auswertung der Daten, die Erstellung der Tabellen und Grafiken in dieser Arbeit wurden mit MS Excel 2007[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Die Grafiken wurden nachträglich mit Irfan View Version 4.28[©] 2014 Irfan Skiljan) bearbeitet, z.B. wurden Balken zur Darstellung statistischer Relevanz nachträglich eingefügt.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Tobias Höller aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie (IMBIE) der Universität Bonn. Bei der P-Wert Berechnung wurden der exakte Test nach Fisher und der Chi-Quadrat Test zweiseitig angewendet. Software: SPSS STATISTICS[®] für Windows[®] (Version 20, IBM, Armonk, NY, USA). Statistische Signifikanz wurde für P-Werte $<0,05$ angenommen.

2.8 Textbearbeitung

Das Literaturverzeichnis wurde teilweise unter Verwendung von EndNote[®] for Students Version X3.0.1 (Thomson Reuters, New York, NY, USA) erstellt. Die Arbeit wurde mit MS Word 2007[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) geschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Knochenmarkstanzbiopsien

Es zeigte sich, dass die Knochenmarkstanzen der Gruppe „normal“ ganz überwiegend keine vermehrte LSD1 Expression aufwiesen (14/15; 93,3 %). Demgegenüber wurde in einem erheblichen Anteil sowohl der Knochenmarkstanzen mit reaktiven Veränderungen als auch der mit neoplastischer Infiltration eine starke LSD1 Expression gefunden (siehe Tabelle 11). Die Kriterien der einzelnen Gruppen sind in Kapitel 2.1.1 erläutert.

In MPN Fällen unter Nichtberücksichtigung der CML fand sich eine starke oder moderate Expression von LSD1 in der Hälfte der untersuchten Fälle (26/52; 50 %). Vorwiegend Megakaryozyten und Erythrozyten, aber auch in geringerem Ausmaß frühe myeloische Vorläuferzellen, konnten dabei als LSD1 positiv identifiziert werden. Dabei zeigten die Knochenmärker der Patienten, die an PMF oder ET litten, am häufigsten eine starke Expression. In CML Fällen wurde dagegen nur in etwa einem Drittel der Fälle moderate oder starke Expression in den oben beschriebenen Zellreihen gefunden (6/19; 31,6 %).

Des Weiteren zeigte sich auch in MDS Fällen häufig starke oder moderate nukleäre LSD1 Expression vorwiegend in dysplastischen Megakaryozyten und frühen erythroiden Vorläuferzellen (9/16; 56,3 %). Auch in den dysplastischen monozytischen Zellen und Megakaryozyten der CMML konnte diese Expression gezeigt werden (5/10; 50 %). Regelmäßig fand sich LSD1 Expression in Blasten von primären und sekundären AML Fällen (21/45; 46,7 %). In den verschiedenen Untergruppen der AML war meist etwa die Hälfte der Fälle stark positiv oder gänzlich negativ, nur wenige Fälle zeigten dagegen moderate Expression des LSD1. Innerhalb der heterogenen Gruppe „Blastenkrise bei MPN“ waren alle untersuchten Fälle LSD1 negativ, dies waren allerdings insgesamt nur sieben Fälle. Bei den untersuchten akuten lymphatischen Leukämien war dagegen die Mehrzahl der Fälle nukleär positiv auf LSD1 Expression in Blasten (7/12; 58,3 %). In den meisten Biopsien akuter Leukämien waren die verschiedenen Zellreihen aufgrund der oft starken blastären Infiltration nicht adäquat zu beurteilen. In solchen Fällen diente allein die Beurteilung der Blasten zur Klassifizierung.

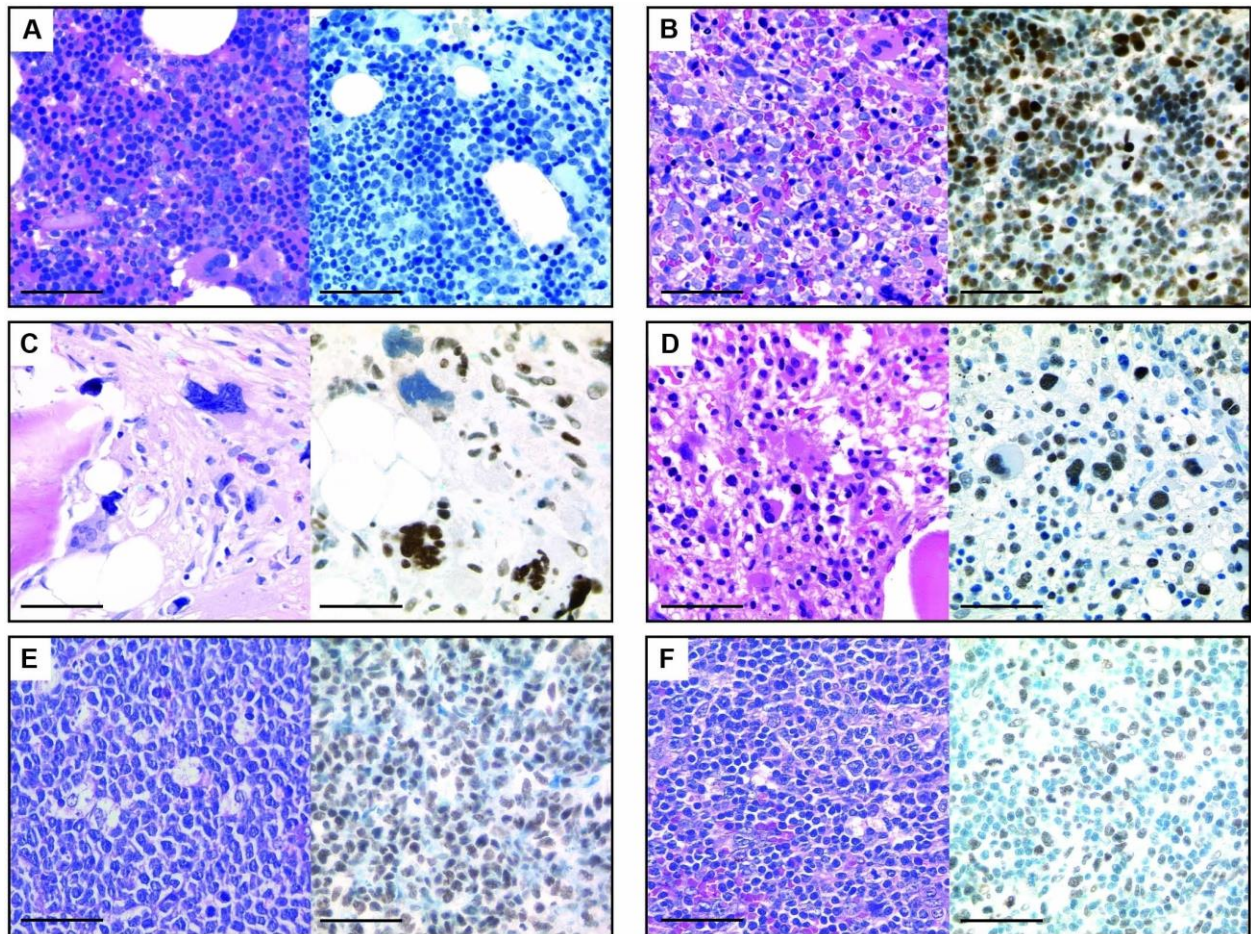


Abb. 4: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese sowie in Knochenmarkern mit neoplastischer Infiltration, Histologie

(A-F): Jeweils HE Standardfärbung und LSD1 immunhistochemische Färbung in 400facher Vergrößerung, Balken 50µm. (A): Reaktive erythroide Hyperplasie bei Anämie, keine Expression. (B): Vitamin-B12-Mangel Anämie, starke Expression in Megakaryopoese und Erythropoese. (C): Primäre Myelofibrose, LSD1 positive und negative Megakaryozyten liegen teilweise dicht beieinander. (D): MDS RAEB I, LSD1 Expression in allen Zelllinien nachweisbar. (E): Akute Promyelozytenleukämie. (F): Sekundäre AML M7 mit myelodysplastischen Merkmalen. (E-F): Spezifische LSD1 Expression in Blasten.

Tab. 11: LSD1 Expression in 197 untersuchten Knochenmarkstanzen

Einteilung der LSD1 Expression nach zuvor beschriebenem Schlüssel in negativ (neg) für Score 0 und 1, moderat (mod) für Score 2 und starke Expression für Score 3. Einteilung der nicht neoplastisch infiltrierten Knochenmarker in „normal“ und „reaktiv“ gemäß peripherem Blutbild und klinischem Kontext, siehe Kapitel „Methoden“. Absolute Prozentwerte ungleich 100 % resultieren aus der Rundung auf eine Dezimale.

Abkürzungen: ICD-O-3: Klassifikation für onkologische Erkrankungen der WHO, dritte Edition; MPN: Myeloproliferative Neoplasie; MDS/MPN: Neoplasie mit myelodysplastischen und myeloproliferativen Merkmalen; MDS: Myelodysplastisches Syndrom; AML: Akute myeloische Leukämie; ALL: Akute lymphatische Leukämie; CML: Chronisch myeloische Leukämie; PV: Polyzythämia Vera; PMF: Primäre Myelofibrose; ET: Essentielle Thrombozythämie; CMML: Chronisch myelomonozytäre Leukämie; RA: Refraktorische Anämie; RARS: Refraktorische Anämie mit Ringsideroblasten; RAEB I / II: Refraktorische Anämie mit Blastenüberschuss; AML mit rek. Gen. Abn.: Akute myeloische Leukämie mit rekurrenten genetischen Aberrationen; AML, NOS: Akute myeloische Leukämie nicht weiter spezifiziert; B-ALL/T-ALL: Akute lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ/T-Zell Typ.

| | ICD-O-3 | | n | neg (%) | mod (%) | stark (%) |
|---------|----------|--|----|-----------|----------|-----------|
| Normal | Entfällt | | 15 | 14 (93,3) | 1 (6,7) | 0 (0,0) |
| Reaktiv | Entfällt | | 27 | 9 (33,3) | 7 (25,9) | 11 (40,7) |
| MPN | 9875 / 3 | CML | 19 | 13 (68,4) | 5 (26,3) | 1 (5,3) |
| | 9950 / 3 | PV | 9 | 6 (66,7) | 1 (11,1) | 2 (22,2) |
| | 9961 / 3 | PMF | 31 | 13 (41,9) | 7 (22,6) | 11 (35,5) |
| | 9962 / 3 | ET | 12 | 7 (58,3) | 1 (8,3) | 4 (33,3) |
| MDS/MPN | 9945 / 3 | CMML | 10 | 5 (50,0) | 3 (30,0) | 2 (20,0) |
| MDS | Vers. | RA, RCMD, RAEB I, RAEB II | 16 | 7 (43,8) | 2 (12,5) | 7 (43,8) |
| AML | Vers. | AML mit rek. gen. Abn. | 7 | 3 (42,9) | 0 (0,0) | 4 (57,1) |
| | 9895 / 3 | AML mit MDS assoziierten Veränderungen | 18 | 8 (44,4) | 2 (11,1) | 8 (44,4) |
| | 9861 / 3 | AML, NOS | 13 | 6 (46,2) | 1 (7,7) | 6 (46,2) |
| | Entfällt | Blastenkrise bei MPN | 7 | 7 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| ALL | 9811 / 3 | B-ALL | 11 | 5 (45,5) | 3 (27,3) | 3 (27,3) |
| | 9837 / 3 | T-ALL | 2 | 0 (0,0) | 1 (50,0) | 1 (50,0) |

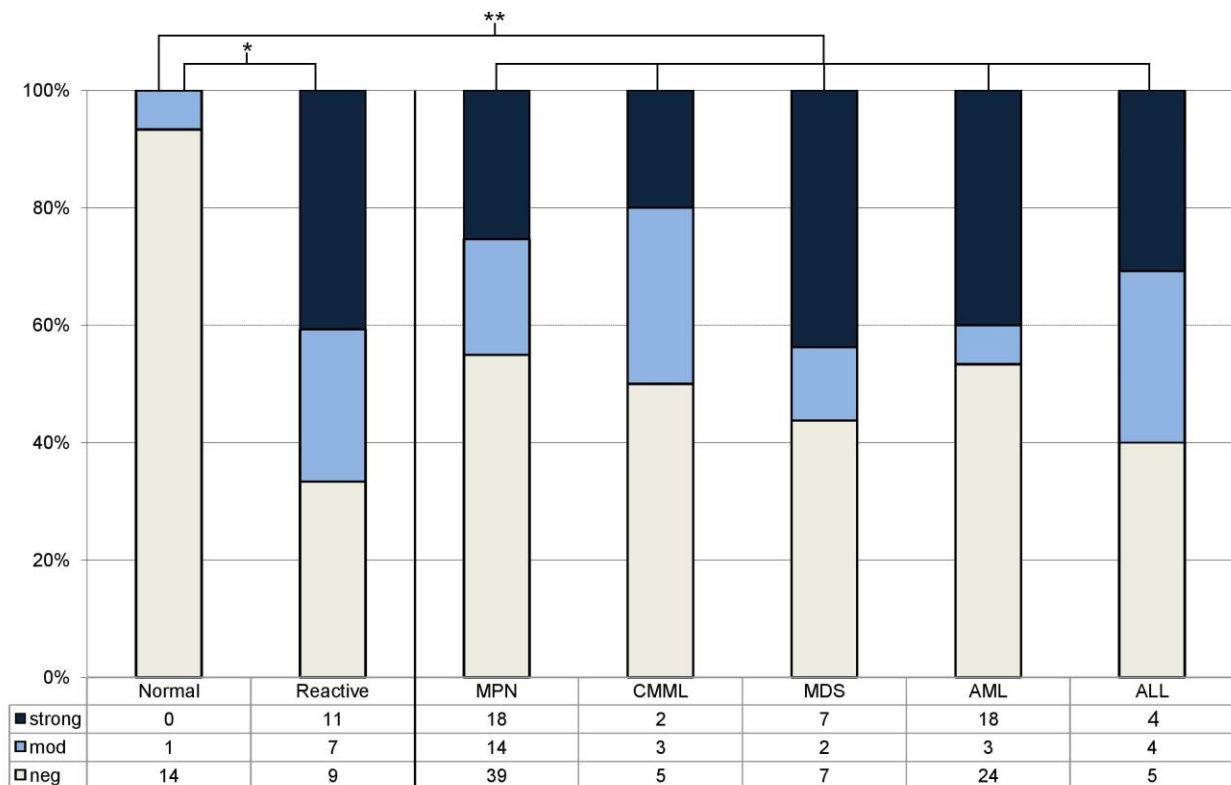


Abb. 5: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese sowie in Knochenmärgern mit neoplastischer Infiltration, Balkendiagramm

Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Expression von LSD1 im Vergleich von normaler zu reaktiver Hämatopoese (*:P<0,001, zweiseitiger exakter Fisher-Test) und im Vergleich von normaler zu neoplastischer Hämatopoese (**:P<0,002, zweiseitiger exakter Fisher-Test). Innerhalb der neoplastischen Erkrankungen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Eine genauere Gliederung der Ergebnisse der Gruppen „normal“ und „reaktiv“ kann Tabelle 12 entnommen werden. Zwecks statistischer Auswertung und zum Erreichen einer adäquaten Gruppengröße wurden diese Fälle allerdings, wie oben gezeigt, zusammengefasst.

Tab. 12: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese, getrennt nach Diagnosegruppen

„Malignomausschluss“ bedeutet in diesem Falle eine Knochenmarkbiopsie, die eine maligne Krankheit ausschließt; „Staging“ ist dagegen eine Knochenmarkbiopsie bei vorliegender maligner Erkrankung, meist malignem Lymphom, ohne Infiltration des Knochenmarks; „Mastozytose“ beschreibt Knochenmarkstanzen zum Ausschluss einer systemischen Mastozytose; „unklare Zytopenie“ schließt Fälle ein, bei denen eine Knochenmarkbiopsie ohne konkreten Malignomverdacht aufgrund von Zytopenien veranlasst wurde; „Nachsorge“ schließt Fälle mit onkologischer Erkrankung in der Anamnese ein, die zuvor Chemotherapie oder Bestrahlung erhielten, aber zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen Knochenmarkbefall zeigten; „Sonstiges“: Ein Fall von reaktiver Hyperplasie aller Zellreihen (LSD1-negativ), ein Fall von Plasmazellvermehrung bei HIV (LSD1-positiv).

| | n | neg (%) | mod (%) | pos (%) | f (%) | m (%) |
|----------------------------|----|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| normal Malignomausschluss | 1 | 1 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (100,0) |
| Staging | 12 | 11 (91,7) | 1 (8,3) | 0 (0,0) | 5 (41,7) | 7 (58,3) |
| Mastozytose | 2 | 2 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 2 (100,0) | 0 (0,0) |
| reaktiv Malignomausschluss | 6 | 2 (33,3) | 0 (0,0) | 4 (66,7) | 2 (33,3) | 4 (66,7) |
| Staging | 6 | 3 (50,0) | 0 (0,0) | 3 (50,0) | 1 (16,7) | 5 (83,3) |
| unklare Zytopenie | 5 | 3 (60,0) | 1 (20,0) | 1 (20,0) | 1 (20,0) | 4 (80,0) |
| Nachsorge | 8 | 0 (0,0) | 6 (75,0) | 2 (25,0) | 4 (50,0) | 4 (50,0) |
| sonstiges | 2 | 1 (50,0) | 0 (0,0) | 1 (50,0) | 0 (0,0) | 2 (100,0) |

Es ist allerdings auffällig, dass unter den Fällen, die im Rahmen hämatologischer Nachsorge untersucht wurden, kein einziger gänzlich negativer Fall ist.

Eine genauere Gliederung der Gruppe „MDS“ nach Untergruppen kann Tabelle 13 entnommen werden. Zwecks statistischer Auswertung und zum Erreichen einer adäquaten Gruppengröße wurden diese Fälle allerdings, wie oben gezeigt, auch hier zusammengefasst.

Tab. 13: LSD1 Expression in Knochenmarkern von MDS-Patienten, getrennt nach Untergruppen

Abkürzungen: MDS: Myelodysplastisches Syndrom; RA: Refraktäre Anemie; RCMD: Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie; RAEB I / II: Refraktarische Anemie mit Blastenüberschuss, I (5-9 %), II (10-19 %).

| | n | neg (%) | mod (%) | pos (%) | f (%) | m (%) |
|---------|---|-----------|----------|----------|----------|----------|
| MDS RA | 2 | 2 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (50,0) | 1 (50,0) |
| RCMD | 5 | 2 (40,0) | 0 (0,0) | 3 (60,0) | 1 (20,0) | 4 (80,0) |
| RAEB I | 5 | 1 (20,0) | 2 (40,0) | 2 (40,0) | 1 (20,0) | 4 (80,0) |
| RAEB II | 4 | 2 (50,0) | 0 (0,0) | 2 (50,0) | 1 (25,0) | 3 (75,0) |

Anhand der geringen Fallzahlen ist eine Interpretation getrennt nach Untergruppen für das MDS wenig sinnvoll. Das Kollektiv setzt sich, wie statistisch zu erwarten, vor allem aus Fällen mit Mehrliniendysplasie und Fällen mit berschuss an Blasten zusammen.

3.2 Lymphatische Gewebe

Bei der Auswertung der TMAs lymphatischer Gewebe zeigte sich im Vergleich zu den neoplastisch infiltrierten Knochenmarkern seltener eine moderate oder starke Expression von LSD1 ($P < 0,004$, zweiseitiger Chi-Quadrat Test). Gleichzeitig färbte sich auch das lymphatische Stroma teilweise unspezifisch reaktiv an, sodass eine Beurteilung der malignen Zellen erschwert wurde. Es wurde nicht weiter analysiert, welche stromalen Zellen sich reaktiv anfarbten; morphologisch entstand der Eindruck, dass sowohl normale T-Zellen wie auch B-Zellen, vorwiegend Zentroblasten, teilweise LSD1 positiv sind; insgesamt betrachtet, war dies jedoch nur eine geringe Anzahl von Zellen.

Generell zeigte sich eine starke Expression weit weniger häufig als bei der Untersuchung der Knochenmarkstanzen. Des Weiteren zeigten vor allem die niedrigmalignen B-Zell Lymphome, wie z.B. die CLL Fälle und die Fälle folliculärer Lymphome niedrigeren Grades, sehr häufig schwache Expression oder gar keine LSD1 Expression (siehe Tabelle 14). Hochmaligne B-Zell Lymphome und T-Zell Lymphome demonstrierten generell weitaus häufiger LSD1 Expression ($P < 0,001$, zweiseitiger Chi-

Quadrat Test), diese fiel jedoch insgesamt wesentlich schwächer aus als in den Knochenmarkstanzbiopsien (siehe Abbildung 4 und 6).

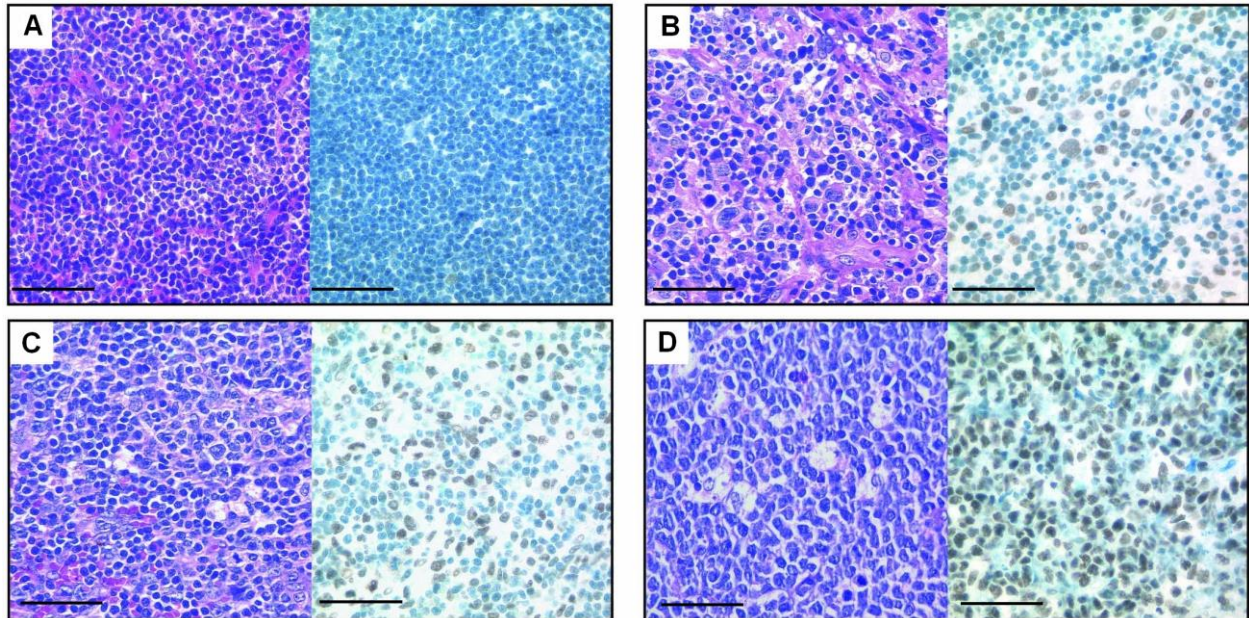


Abb. 6: LSD1 Expression in lymphatischen Neoplasien, Histologie

(A-D): HE Standardfärbung und LSD1 immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebetteten Lymphknoten-Biopsien in TMAs, jeweils 400fache Vergrößerung; Balken 50µm. (A): B-CLL, keine LSD1 Expression. (B): Hodgkin Lymphom. (C): DLBL. (D): Burkitt Lymphom. (B-D): LSD1 Expression in malignen Zellen, am stärksten in hochmalignen Burkitt Zellen. Die meisten Fälle lymphatischer Neoplasien zeigten im Falle von LSD1 Expression lediglich eine moderate Anfärbung in der immunhistochemischen Färbung im Gegensatz zu den oft kräftig anfärbenden Knochenmarkstanzbiopsien.

Tab. 14: LSD1 Expression in 354 untersuchten Biopsien lymphatischen Gewebes in TMAs

Einteilung anhand der Intensität der LSD1 Expression in malignen Zellen in negativ (neg), moderat (mod) und starke (strong) Expression. Positive Wertung nur bei Expression in mindestens 10 % der Tumorzellen. Wertung jeweils in der TMA Stanze mit der besten Beurteilbarkeit nach vorheriger Diagnosestellung an Standardschnitten.

Abkürzungen: ICD-O-3: Klassifikation für onkologische Erkrankungen der WHO, dritte Edition; B-NHL / T-NHL: Non-Hodgkin-Lymphom vom B-Zell / T-Zell Typ; CLL / SLL: Chronisch lymphatische Leukämie / kleinzelliges B-Zell Lymphom; DLBL: Diffus Großzelliges B-Zell Lymphom; AITL: Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom; ALCL: Anaplastisches großzelliges Lymphom; PTCL, NOS: Peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifiziert, NLPHL: Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom.

| | ICD-O-3 | | n | neg (%) | mod (%) | strong (%) |
|-------------------------|----------|-----------------------------|-----|------------|-----------|------------|
| Niedrigmaligne B-NHL | 9823 / 3 | CLL / SLL | 36 | 36 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | 9699 / 3 | Marginalzonen Lymphom | 21 | 16 (76,2) | 5 (23,8) | 0 (0,0) |
| | 9690 / 3 | Folikuläres Lymphom 1 & 2 | 57 | 54 (94,7) | 3 (5,3) | 0 (0,0) |
| | 9673 / 3 | Mantelzell Lymphom | 33 | 22 (66,7) | 11 (33,3) | 0 (0,0) |
| Hochmaligne B-NHL | 9690 / 3 | Folikuläres Lymphom 3a & 3b | 20 | 15 (75,0) | 4 (20,0) | 1 (5,0) |
| | 9680 / 3 | DLBL , NOS | 102 | 63 (61,8) | 29 (28,4) | 10 (9,8) |
| | 9687 / 3 | Burkitt Lymphom | 9 | 1 (11,1) | 8 (88,9) | 0 (0,0) |
| T-NHL | 9705 / 3 | AITL | 8 | 2 (25,0) | 6 (75,0) | 0 (0,0) |
| | 9714 / 3 | ALCL | 6 | 0 (0,0) | 4 (66,7) | 2 (33,3) |
| | 9705 / 3 | PTCL, NOS | 7 | 5 (71,4) | 2 (28,6) | 0 (0,0) |
| Hodgkin Lymphom | 9663 / 3 | Nodulär sklerosierend | 36 | 14 (38,9) | 19 (52,8) | 3 (8,3) |
| | 9652 / 3 | Mischtyp | 10 | 2 (20,0) | 8 (80,0) | 0 (0,0) |
| | 9651 / 3 | Lymphozytenreich | 5 | 0 (0,0) | 5 (100,0) | 0 (0,0) |
| | 9659 / 3 | NLPHL | 4 | 1 (25,0) | 3 (75,0) | 0 (0,0) |

Am häufigsten wurde LSD1 Expression in aggressiven Lymphomen gefunden. Somit zeigten die allermeisten Fälle von Burkitt Lymphomen eine moderate Expression (8/9; 88,9 %); bei den wenigen untersuchten Fällen von anaplastisch großzelligen Lymphomen fand sich kein einziger Fall, der nicht zumindest eine moderate Expression zeigte.

Innerhalb der Hodgkin Lymphome konnte LSD1 Expression in allen untersuchten Subtypen in über der Hälfte der Fälle gezeigt werden. Die Subgruppe des nodulär sklerosierenden Typs hatte dabei den geringsten Anteil an LSD1 positiven Fällen (22/36; 61,1 %), allerdings dafür einige Fälle, die starke Expression zeigten.

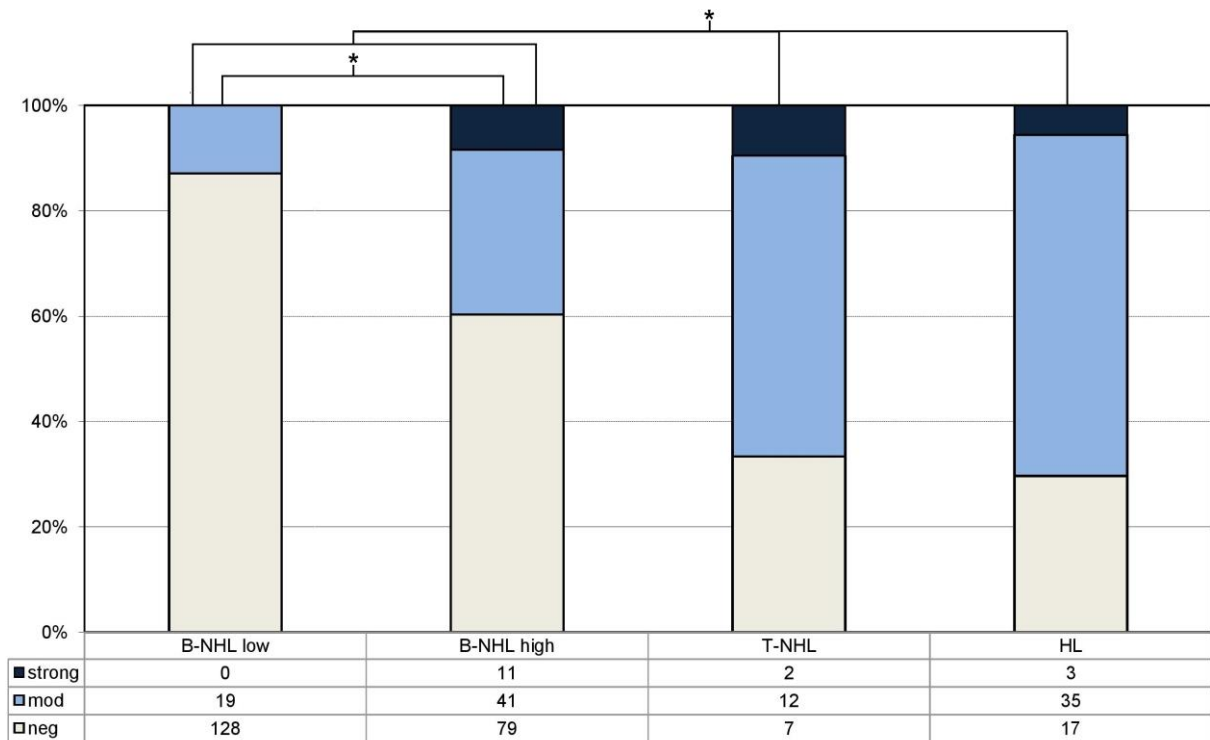


Abb. 7: LSD1 Expression in lymphatischen Neoplasien, Balkendiagramm

Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Expression von LSD1 im Vergleich von niedrigmalignen B-NHL (B-NHL low) zu hochmalignen B-NHL (B-NHL high) (* $P < 0,001$, zweiseitiger Chi-Quadrat Test). Bei dieser Berechnung wurde die moderate und starke Expression als positiv gewertet gegenüber den gänzlich negativen Fällen. Generell zeigten die lymphatischen Neoplasien eher schwächere Expression verglichen mit der Expression in den Knochenmarkstanzbiopsien. Des Weiteren zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied sowohl zwischen B-NHL kombiniert und T-NHLs und zwischen B-NHLs und HLs (jeweils * $P < 0,001$, zweiseitiger Chi-Quadrat Test). Abkürzungen: T-NHL: Non-Hodgkin Lymphom der T-Zell Reihe; HL: Hodgkin Lymphom.

4. Diskussion

Um die Ergebnisse dieser Arbeit einzuordnen, müssen einige Bemerkungen voran gestellt werden.

Wie bereits zuvor erwähnt, wäre es wünschenswert, die Expression von LSD1 in Knochenmarkbiopsien eines gänzlich gesunden Kollektivs zu untersuchen, um diese mit neoplastischer Hämatopoese zu vergleichen. Da bei asymptomatischen, gesunden Probanden jedoch keine diagnostischen Beckenkammstanzbiopsien durchgeführt werden, war es nötig, die Gruppe „normal“ wie zuvor beschrieben zu definieren. Auch wenn dabei streng auf regelhaft differenzierende Hämatopoese und ein normwertiges peripheres Blutbild geachtet wurde, ist diese Gruppe keineswegs als homogen zu betrachten. Das gleiche gilt insbesondere für die Gruppe „reaktiv“, da die Patienten teilweise sehr unterschiedliche klinische Vorgeschichten aufwiesen und die Zytopenien unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Nichtsdestoweniger sollte diese Auswahl an Patienten eine Übersicht über nicht-neoplastische Hämatopoese ermöglichen und konnte dies auch leisten. Die Zusammensetzung und das Scoring dieser Gruppen kann Tabelle 6 und 12 entnommen werden.

Ein weiterer erwähnenswerter Aspekt ist, dass in dieser Arbeit die Knochenmarkbiopsien von ALL Patienten ausnahmslos von erwachsenen Personen stammten und somit per se nicht klassischen ALL Fällen entsprechen, die bei Kindern auftreten. ALL Fälle im Erwachsenenalter sind oftmals prognostisch schlechter einzustufen als solche im Kindesalter (Borowitz und Chan, 2008); dem liegen vermutlich neben der besseren Toleranz zytostatischer Therapie bei Kindern auch biologische Ursachen zu Grunde. Da in dieser Untersuchung innerhalb des Gesamtkollektivs jedoch größtenteils Gewebe von Erwachsenen untersucht wurde, erschien eine Beschränkung auf Knochenmarkbiopsien von Erwachsenen sinnvoll. Dies war aber kein generelles Ausschlusskriterium, denn innerhalb der lymphatischen Neoplasien wurden vereinzelt Fälle von pädiatrischen Patienten untersucht (siehe Spannweite des Alters in den Tabellen 6 und 8).

Während in der Literatur viele Studien anhand Genexpressionsanalysen bestimmte Marker nachweisen, wurde in dieser Arbeit bewusst die Technik der Immunhistochemie

zur Quantifizierung der LSD1 Expression gewählt. Mit ihr ist es möglich, das Ausmaß und die Relevanz der LSD1 Expression auf Proteinebene zu untersuchen. Die Verfügbarkeit des asservierten und für diagnostische Zwecke nicht mehr benötigten Materials im Archiv des Pathologischen Instituts erleichterte ebenso wie der Einsatz der Technik des Tissue Micro Arrays das Erreichen der notwendigen großen Fallzahl eines Kollektivs hämatologischer Neoplasien, um statistische Relevanz zu ermöglichen. Ein Problem in der Anwendung dieser Technik für eine wissenschaftliche Untersuchung ist allerdings ihr semiquantitativer Charakter. Die Beurteilung der Expression in den einzelnen Schnitten ist letztendlich immer eine subjektive Einschätzung des Untersuchers. Eine Verblindung des Untersuchers ist prinzipiell nicht möglich, da die Standardschnitte zur Identifizierung von Tumorzellen und verschiedenen Zelllinien stets mitbeurteilt werden müssen und der erfahrene Hämatopathologe anhand verschiedener histologischer Muster das Präparat sofort diagnostisch einordnet. Eine unterbewusst höhere beziehungsweise niedrigere Beurteilung der Expression für verschiedene Diagnosen lässt sich also nicht ganz ausschließen, was zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen kann.

Im Folgenden soll eine Einordnung der Ergebnisse dargestellt werden. Auffällig war der eklatante Unterschied zwischen normaler Hämatopoese und sowohl reaktiver als auch neoplastischer Hämatopoese generell (siehe Abbildung 4). Da LSD1 unverzichtbare Funktionen in der Ausreifung normaler Hämatopoese besitzt (Kerenyi et al., 2013), ist davon auszugehen, dass im Rahmen der starken immunhistochemischen Färbung vor allem Überexpression zur Darstellung kam, die in vielen anderen Tumoren als prognostisch aussagekräftig eingeschätzt wird. Diese Einschätzung sollte zukünftig mittels geeigneter quantitativer Verfahren untermauert werden.

Trotz stärkerer Expression in schnell proliferierenden Entitäten ist LSD1 allerdings nicht als reiner Proliferationsmarker anzusehen, denn es waren teilweise auch zellulär verarmte Knochenmäcker in ihrer Expression LSD1 positiv, so zum Beispiel PMF Fälle. Andererseits gab es einen Burkitt Lymphom Fall, der sehr stark proliferierte, aber keine LSD1-Expression aufwies. Eine Überexpression von LSD1 scheint also eher mit einem bestimmten Zustand des Chromatins assoziiert zu sein, der ein wiederkehrendes Merkmal in verschiedenen Tumoren, aber auch in reaktiv aktivierter Hämatopoese, v.a.

Megakaryopoese und Erythropoese, ist. Als Chromatinzustand mit Assoziation zu malignen Erkrankungen ist LSD1 Überexpression aber nicht isoliert zu sehen. Auch die Überexpression anderer epigenetischer Regulatoren ist teilweise mit maligner Entartung assoziiert (Abdel-Wahab und Levine, 2013; Arrowsmith et al., 2012). Definitiv stellt dieser Zustand abseits seines physiologischen Auftretens im Rahmen von Zellerneuerung bei reaktiven Veränderungen des Knochenmarks aber eine Dysregulation bzw. Imbalance der epigenetischen Kontrolle der Zelldifferenzierung dar. Dass in allen untersuchten Entitäten jedoch ein hoher Prozentanteil an gänzlich negativen Fällen vorkommt, lässt LSD1 als Marker z.B. für MPN unbrauchbar werden. Wie in Abbildung 4 erkennbar, liegen Zellen mit vermehrter Expression teilweise dicht neben gänzlich negativen Zellen, in diesem Falle Megakaryozyten. Diese unterschiedlichen epigenetischen Zustände eigentlich klonal expandierender Zellen bedürfen weiterer Klärung.

Auffällig an den Ergebnissen dieser Untersuchung ist einerseits, dass die untersuchten Gruppen myeloischer Neoplasien durchweg eine relativ starke Expression von LSD1 in einem großen Anteil der Fälle zeigten, lymphatische Neoplasien dagegen weitaus seltener und deutlich schwächer. Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen niedrigmalignen und hochmalignen Entitäten der lymphatischen Reihe. Dies unterstützt die These, dass LSD1 Überexpression eher mit aggressiven Tumoren assoziiert ist und weniger häufig mit indolent verlaufenden Tumoren, vergleichbar der negativen prognostischen Aussage durch Überexpression innerhalb der heterogenen Gruppe von Prostatakarzinomen (Crea et al., 2012).

4.1 Therapeutische Relevanz

Es wird davon ausgegangen, dass es in verschiedenen Tumoren keinen generellen Defekt in der epigenetischen Landschaft gibt, sondern eher ein sehr vielschichtiges Bild verschiedener Aberrationen (Varier und Timmers, 2011). Somit wird es eine Herausforderung sein, die richtigen Patienten für neuartige Therapien zu selektieren, da die epigenetische Regulation der verschiedenen entarteten Zellen in unterschiedlichen Zielregionen alteriert sein kann.

Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass LSD1 für die Differenzierung in normaler Hämatopoese substanziell ist, da konstitutiver Knockout in schwerwiegender Panzytopenie resultierte (Kerenyi et al., 2013). Somit könnten bei spezifischer inhibitorischer Therapie ein starker Abfall der Zellzahlen im Blutbild resultieren, wie auch schon von anderen Autoren angeführt wurde (Sprussel et al., 2012). Allerdings ist diese Nebenwirkung auch bei konventioneller zytostatischer Therapie ein gängiges Problem, das sich klinisch mittels Transfusionen und / oder Gabe von Wachstumsfaktoren wie EPO, G-CSF etc. beherrschen lassen könnte. Vor diesem Hintergrund ist ein möglicher klinischer Einsatz dennoch stark von einer ausreichenden therapeutischen Breite und Selektivität neuer Substanzen abhängig, sodass eine Tumor schädigende Wirkung bei möglichst geringer hämatotoxischer Wirkung erzielt werden könnte (Di Constanzo 2014; Kerenyi et al., 2013). Andererseits fand eine Arbeitsgruppe, die AML in immundefizienten Mäusen mit dem spezifischen LSD1 Inhibitor SP2509 behandelte, keinen relevanten toxischen Effekt, was eine vielversprechende Beobachtung darstellt (Fiskus et al., 2014). Angesichts der Vielzahl von weiteren Funktionen im Organismus, erscheint es allerdings äußerst schwierig weitere Nebenwirkungen einzugrenzen. Die Ähnlichkeit von LSD1 mit MAO rückt eine starke Inhibition in die Nähe von neurologischen Nebenwirkungen. Es werden auch verschiedene neurologische Erkrankungen mit Dysregulation epigenetischer Enzyme wie zum Beispiel HDAC2 in Verbindung gebracht, die im Komplex mit LSD1 reagiert (Arrowsmith et al., 2012). Aktuell lässt sich also schwerlich abschätzen, welche Bedeutung eine therapeutische Intervention auf das zentrale Nervensystem und assoziierte neurologische Auswirkungen hätte.

Es wird abhängig von potentiellen Gewebe spezifischen Nebenwirkungen gefordert, Tumor spezifische Inhibitoren und auch Aktivatoren verschiedener Histon-modifizierender Enzyme zu finden, um tatsächlich eine zielgerichtete Therapie durchführen zu können und Nebenwirkungen durch mangelnde Selektivität einzugrenzen (Black und Whetstine, 2013). Es muss konstatiert werden, dass vor allem die Balance aus dem richtigen Level an Histonmethylierung für die Beibehaltung der richtigen Zelldifferenzierung entscheidend zu sein scheint, da in manchen AML Formen auch die Gegenspieler des LSD1, die Lysinmethyltransferasen (z.B. MLL1, eine H3K4 Methyltransferase), überexprimiert sind (Krivtsov und Armstrong, 2007). Es ist also

durchaus nicht unwahrscheinlich, dass verschiedene Patienten mit phänotypisch ähnlichen Erkrankungen gegensätzliche Therapien benötigen. Die Wirksamkeit einzelner Stoffe könnte teilweise schwer vorhersehbar sein, sodass, wie anfangs angesprochen, eine sinnvolle Patientenselektierung von zentraler Bedeutung sein wird und es wünschenswert wäre, Surrogatmarker für epigenetische Dysregulation zu identifizieren. Allerdings sind die Techniken zur quantitativen Analyse der Expression epigenetischer Zustandsmarker aktuell noch aufwendig und eignen sich nicht für die Routinediagnostik. Die Zukunft dürfte verbesserte diagnostische Möglichkeiten bezüglich solcher Veränderungen bringen, sodass diese initialen Beobachtungen später direkte therapeutische Relevanz erhalten könnten. Ein gewisses Maß an Zurückhaltung ist jedoch auch dadurch geboten, dass einige Autoren die Wirkung epigenetischer Inhibition als womöglich dichotom beschreiben. Einerseits könnten, wie beabsichtigt, onkogene Genexpressionsmuster abgeschaltet werden; unter Umständen ist es aber auch denkbar, dass gleichzeitig Tumor-suppressive Gene herunterreguliert werden (Arrowsmith et al., 2012). Ein Nettoeffekt dieser therapeutischen Intervention könnte dann negativ oder positiv bezüglich des Tumorwachstums bzw. der Zellproliferation und -differenzierung ausfallen. Auch ist unklar, ob selektivere Inhibition wirklich mit geringeren Nebenwirkungen einhergeht, da der komplexe epigenetische Apparat sehr stark miteinander interagiert, wie in der Einleitung dargestellt wurde.

Unabhängig von dem Problem möglicher unvorhersehbarer Nebenwirkungen durch fehlende Selektivität oder unerwarteter Wechselwirkungen innerhalb der epigenetischen Zellmaschinerie besteht bei allen spezifischen Therapien („Targeted Therapies“) die Möglichkeit, dass maligne Zellen durch Mutationen innerhalb der Zielstrukturen resistent gegenüber den Therapeutika werden (Engelman und Settleman, 2008). Demnach ist zu überprüfen, inwiefern solche Ansätze als kurativ oder palliativ angesehen werden können. Nichtsdestoweniger sind diese Therapieoptionen vor dem Hintergrund gewachsener Kenntnisse der Tumorbioogie unverzichtbar und könnten zu einer Prognoseverbesserung beitragen, auch wenn die Therapieintention nicht unbedingt dauerhafte Heilung ist. Das oft zitierte Beispiel der CML zeigt, dass die Identifikation molekularer Mechanismen und selektive Inhibition der selbigen zu drastischen Prognoseverbesserungen führen kann (Druker et al., 2007)

Das Fazit dieser Arbeit kann also in Bezug auf obige Fragestellung wie folgt formuliert werden: Sollten LSD1 Inhibitoren vielversprechende Ergebnisse in klinischen Studien bei soliden Tumoren und AML zeigen, ist eine mögliche Anwendung auch bei anderen hämatologischen Krankheiten denkbar, wenn eine Überexpression beim jeweiligen Patienten nachgewiesen werden kann. Diese Untersuchung liefert erste Hinweise darauf, dass dies in einer Vielzahl hämatologischer Erkrankungen der Fall sein könnte.

4.2 Differentialdiagnostische Relevanz

Im Hinblick auf die Fragestellung, inwiefern eine immunhistochemische Färbung mit monoklonalem LSD1 Antikörper in der Differenzialdiagnostik der hämatologischen Krankheitsbilder hilfreich sein kann, wurde folgendes Fazit erarbeitet: Eine Verwendung zur diagnostischen Unterscheidung zwischen verschiedenen hämatologischen Neoplasien ist allenfalls in lymphatischen Neoplasien denkbar; hier fällt eine Unterscheidung zwischen niedrigmalignen und hochmalignen Subtypen aber meist nicht schwer und die wichtige Subklassifizierung beruht auf einer Vielzahl weiterer immunhistochemischer Färbungen, die somit unverzichtbar bleiben. Die insgesamt eher schwach ausfallenden Anfärbungen verglichen mit myeloischen Neoplasien könnten dabei ein Problem darstellen.

Es konnte kein statistisch relevanter Unterschied zwischen verschiedenen myeloischen Neoplasien gezeigt werden; somit ist eine Verwendung als diagnostischer Marker anhand der Ergebnisse dieser Arbeit vermutlich nicht hilfreich. In allen untersuchten Gruppen neoplastisch infiltrierten Knochenmarks war die LSD1 Färbung in einem beträchtlichen Anteil der neoplastischen Zellen nukleär positiv. Von daher stellt ein positives oder negatives Ergebnis keine Hilfestellung in der Unterscheidung der einzelnen Gruppen dar. Der relativ geringere Anteil positiver CML Fälle gegenüber anderen MPN Fällen ist jedoch eine interessante Beobachtung. Anhand größerer Fallzahlen wäre hier möglicherweise ein signifikanter Unterschied feststellbar; die CML unterscheidet sich schließlich auch klinisch und molekular deutlich von den anderen MPN.

Demgegenüber zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen B-NHL und T-NHL in den untersuchten lymphatischen Geweben. Eine Evaluation an einer größeren

Zahl von lymphatischen Neoplasien der T-Zell Reihe wäre erforderlich, um diese Vermutung zu untermauern. Die meist schwierigere Unterscheidung zwischen T-NHL und Hodgkin Lymphomen wird durch die LSD1 Immunhistochemie anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht erleichtert, da hier eine Expression in den Tumorzellen bei beiden Gruppen häufig wenn auch oft schwach war.

4.3 Ausblick

Die Erkenntnisse dieser und anderer Arbeiten zu dem Thema geben Anlass zur Hoffnung auf neuartige therapeutische und differenzialdiagnostische Möglichkeiten in der Onkologie auf Basis von epigenetischen Markern wie zum Beispiel LSD1.

Da diese Arbeit eine retrospektive Untersuchung von Gewebe darstellt, gibt sie lediglich erste Hinweise auf die Bedeutung der LSD1 Expression in den untersuchten Krankheitsentitäten. Die erhobenen Erkenntnisse bedürfen der Validierung anhand größerer Fallzahlen und weiterer Untersuchung im Rahmen prospektiver Studien. Innerhalb zukünftiger Studien könnte des Weiteren beispielsweise Tumorgewebe von Patienten in vitro kultiviert werden und mit inhibitorischen Substanzen wie Tranylcypromin oder neuartigen selektiveren Inhibitoren behandelt werden. Im Falle einer deutlichen Verringerung der Tumorzellproliferation, wäre dies ein weiterer präklinischer Hinweis auf eine mögliche therapeutische Verwendung.

Sollten sich LSD1 Inhibitoren in den aktuell durchgeführten klinischen Studien als gut verträglich erweisen und vielversprechende Ergebnisse erzielen, so könnten für verschiedene hämato-onkologische Erkrankungen gut selektierte Patientengruppen randomisierten kontrollierten Studien zugeführt werden, um einen möglichen Einsatz in der Patientenversorgung genauer zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) ist eine Histondemethylase, die neben Lysinresten des Histons 3 auch weitere Proteine wie das p53 demethyliert und im Komplex mit anderen Enzymen, wie z.B. Histondeacetylasen (HDACs), einen zentralen Stellenwert in der epigenetischen Regulation einnimmt. In diversen soliden Tumoren wurde in den letzten Jahren eine LSD1 Überexpression gezeigt, die mit hochmaligner Biologie und schlechter Prognose assoziiert ist. Für die akute myeloische Leukämie (AML), eine akute hämato-onkologische Erkrankung, verdichten sich die Hinweise, dass LSD1 in einem Teil der Erkrankungen für eine fehlende Differenzierung der malignen Blasten mitverantwortlich ist. Die Vielzahl anderer hämatologischer Erkrankungen myeloischer und lymphatischer Differenzierung wurde dagegen bisher kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde vor dem Hintergrund einer potenziellen diagnostischen oder therapeutischen Nutzung der Fragestellung nachgegangen, inwiefern in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen eine starke LSD1 Expression vorliegt, da spezifische LSD1 Inhibitoren nach vielversprechenden präklinischen Studien aktuell in klinischen Studien evaluiert werden.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass eine LSD1 Überexpression möglicherweise auch in anderen neoplastischen hämatologischen Krankheitsentitäten neben der AML von Bedeutung ist. Dies trifft vor allem für myeloische Neoplasien wie verschiedene myeloproliferative Neoplasien (MPN) (LSD1 positiv in 32/71, 45,1 %; starke Expression in 18/71, 25,4 %) und myelodysplastischen Syndromen (MDS) (LSD1 positiv in 9/16, 56,3 %; starke Expression in 7/16, 43,8 %) zu. Innerhalb der lymphatischen Neoplasien exprimieren vor allem hochmaligne Entitäten der B-Zell Reihe (LSD1 positiv in 52/131, 39,7 %; starke Expression in 11/131, 8,4 %) und T-Zell Reihe (LSD1 positiv in 14/21, 66,7%; starke Expression in 2/21, 9,5 %) LSD1 in lymphatischen Geweben während dies für niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell Reihe merklich seltener zutrifft (LSD1 positiv in 19/128, 14,8%; starke Expression in keinem Fall nachweisbar). Die Expressionsstärke ist in immunhistochemischen Färbungen lymphatischer Neoplasien also meist geringer als in denen von Knochenmarkstanzbiopsien myeloischer Neoplasien.

Sollten sich neue Therapieansätze mit spezifischen Inhibitoren von LSD1 als Monotherapie oder als Kombinationstherapie mit konventionellen Zytostatika oder anderen zielgerichteten Therapien in klinischen Studien als wirksam erweisen, so wäre gegebenenfalls eine Evaluation der Expressionsstärke vor Therapie relevant. Eine mögliche Verwendung solcher Substanzen im erweiterten Spektrum der Hämatologie und Onkologie bedarf zukünftiger Studien.

6. Anhang

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Fachzeitschrift der American Society of Hematology „Blood“ als Letter to the Editor publiziert worden:

Niebel D, Kirfel J, Janzen V, Höller T, Majores M, Gütgemann I. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in hematopoietic and lymphoid neoplasms. Blood. 2014; 124: 151-152

Des Weiteren wurden sie im Rahmen einer Postersitzung auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) vom 12.-15. Juni 2014 in Berlin vorgestellt.

Ebenfalls wurden sie im Rahmen einer Postersitzung auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO, OeGHO, SGH) vom 10.-14.10.2014 in Hamburg vorgestellt.

7. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Chromatinstruktur in der eukaryonten Zelle | 11 |
| Abb. 2: Reaktionsmechanismen verschiedener Lysinmethylasen | 16 |
| Abb. 3: LSD1 Substratspezifität..... | 17 |
| Abb. 4: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese sowie in Knochenmarkern mit neoplastischer Infiltration, Histologie | 72 |
| Abb. 5: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese sowie in Knochenmarkern mit neoplastischer Infiltration, Balkendiagramm..... | 74 |
| Abb. 6: LSD1 Expression in lymphatischen Neoplasien, Histologie | 77 |
| Abb. 7: LSD1 Expression in lymphatischen Neoplasien, Balkendiagramm | 79 |

8. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Epigenetische Modifikationen und beteiligte Enzymfamilien..... | 14 |
| Tab. 2: WHO Klassifikation hämatopoetischer und lymphatischer Neoplasien..... | 31 |
| Tab. 3: Klassifikation des MDS | 38 |
| Tab. 4: Histologische Typen des Hodgkin Lymphoms | 52 |
| Tab. 5: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der Knochenmarkstanzbiopsien, getrennt nach Geschlecht | 54 |
| Tab. 6: Zusammensetzung des Patientenkollektivs „reaktive“ und „normale“ Knochenmarkbiopsien, getrennt nach Geschlecht | 56 |
| Tab. 7: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Geschlecht und Diagnosegruppen | 57 |
| Tab. 8: Zusammensetzung des Patientenkollektivs der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Geschlecht und Diagnose | 58 |
| Tab. 9: Zusammensetzung der TMA Fälle lymphatischer Neoplasien, getrennt nach Herkunft des Untersuchungsmaterials | 59 |
| Tab. 10: Standardfärbungen der histologischen Knochenmarkdiagnostik | 63 |
| Tab. 11: LSD1 Expression in 197 untersuchten Knochenmarkstanzen | 73 |
| Tab. 12: LSD1 Expression in normaler und reaktiver Hämatopoese, getrennt nach Diagnosegruppen..... | 75 |
| Tab. 13: LSD1 Expression in Knochenmärkern von MDS-Patienten, getrennt nach Untergruppen | 76 |
| Tab. 14: LSD1 Expression in 354 untersuchten Biopsien lymphatischen Gewebes in TMAs..... | 78 |

9. Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 121: 3563-3572

Adamo A, Sese B, Boue S, Castano J, Paramonov I, Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 652-659

Amente S, Bertoni A, Morano A, Lania L, Avvedimento EV, Majello B. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene*. 2010a; 29: 3691-3702

Amente S, Lania L, Avvedimento EV, Majello B. DNA oxidation drives Myc mediated transcription. *Cell Cycle*. 2010b; 9: 3002-3004

Amente S, Lania L, Majello B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1829: 981-986

Anand R, Marmorstein R. Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. *J Biol Chem*. 2007; 282: 35425-35429

Armitage JO. The aggressive peripheral T-cell lymphomas: 2013. *Am J Hematol*. 2013; 88: 910-918

Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11: 384-400

Bennani-Baiti IM, Machado I, Llombart-Bosch A, Kovar H. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1300-1307

Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 2007; 447: 407-412

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009; 23: 781-783

Binda C, Valente S, Romanenghi M, Pilotto S, Cirilli R, Karytinis A, Ciossani G, Botrugno OA, Forneris F, Tardugno M, Edmondson DE, Minucci S, Mattevi A, Mai A. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranylcypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2. *J Am Chem Soc*. 2010; 132: 6827-6833

Black JC, Whetstone JR. Tipping the lysine methylation balance in disease. *Biopolymers*. 2013; 99: 127-135

Borowitz MJ, Chan JKC. Precursor Lymphoid Neoplasms. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 168-178

Bruhn HD, Löffler H, Beck R, El Fatmi R, Müller R, Wacker HH, Schlegelberger B, Göhring G. Hämatologie. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Schäfer H eds., *Labormedizin*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2008: 392-456

Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 88-93

Büchner T, Niederrieser D, Schaich M, Schlenk R, 2014: Akute Myeloische Leukämie. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml> (Zugriffsdatum: 24.10.2014)

Cao F, Townsend EC, Karatas H, Xu J, Li L, Lee S, Liu L, Chen Y, Ouillet P, Zhu J, Hess JL, Atadja P, Lei M, Qin ZS, Malek S, Wang S, Dou Y. Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia. *Mol Cell*. 2014; 53: 247-261

Chen Y, Jie W, Yan W, Zhou K, Xiao Y. Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1): A potential molecular target for tumor therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2012; 22: 53-59

Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*. 2004; 6: 151-158

Cohen I, Poreba E, Kamieniarz K, Schneider R. Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes Cancer*. 2011; 2: 631-664

Crea F, Sun L, Mai A, Chiang YT, Farrar WL, Danesi R, Helgason CD. The emerging role of histone demethylases in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2012; 11: 52

Culhane JC, Szewczuk LM, Liu X, Da G, Marmorstein R, Cole PA. A mechanism-based inactivator for histone demethylase LSD1. *J Am Chem Soc*. 2006; 128: 4536-4537

Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao Y, Jin L, Kuntz KW, Chesworth R, Moyer MP, Bernt KM, Tseng JC, Kung AL, Armstrong SA, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell*. 2011; 20: 53-65

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150: 12-27

Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJ. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 367: 647-657

Delsol G, Falini B, Müller-Hermelink HK, Campo E, Jaffe ES, Gascoyne RD, Stein H, Kinney MC. Anaplastic large cell lymphoma (ALCL), ALK-positive. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 312-316

Dent SYR, Chandra J. The lasting influence of LSD1 in the blood. *Elife*. 2013; 2:00963

Di Costanzo A, Del Gaudio N, Migliaccio A, Altucci L. Epigenetic drugs against cancer: an evolving landscape. *Arch Toxicol*. 2014; 88: 1651-1668

Ding J, Zhang ZM, Xia Y, Liao GQ, Pan Y, Liu S, Zhang Y, Yan ZS. LSD1-mediated epigenetic modification contributes to proliferation and metastasis of colon cancer. *Br J Cancer*. 2013; 109: 994-1003

Dirnhofer S, Went P, Tichelli A. Diagnostic problems in follow-up bone marrow biopsies of patients treated for acute and chronic leukaemias and MDS. *Pathobiology*. 2007; 74: 115-120

Dogan A, Gaulard P, Jaffe ES, Ralfkiaer E, Müller-Hermelink HK. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 309-311

Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Dohner H. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005; 106: 3740-3746

Dreyling M, Herold M, Drach J, Rummel M, Buske C, 2012: Mantelzelllymphom. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/mantelzell-lymphom>
(Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani, So C, Letvak L, Larson RA. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2408-2417

Dührsen U, Fridrik MA, Schmitz N, 2012: Diffuses Großzelliges B-Zell Lymphom. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Gen Dev.* 2008; 18: 73-79

Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2013 update on risk-stratification and management. *Am J Hemat.* 2013; 88: 318-327

Fathi AT, Abdel-Wahab O. Mutations in Epigenetic Modifiers in Myeloid Malignancies and the Prospect of Novel Epigenetic-targeted Therapy. *Advances in Hematology.* 2012; 469592

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 143-153

Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SG, Liu K, Iyer SP, Bearss D, Bhalla KN. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia.* 2014; 11: 2155-2164

Fornieris F, Binda C, Adamo A, Battaglioli E, Mattevi A. Structural basis of LSD1-CoREST selectivity in histone H3 recognition. *J Biol Chem.* 2007; 282: 20070-20074

Forneris F, Binda C, Dall'Aglio A, Fraaije MW, Battaglioli E, Mattevi A. A highly specific mechanism of histone H3-K4 recognition by histone demethylase LSD1. *J Biol Chem.* 2006; 281: 35289-35295

Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Mattevi A, Battaglioli E. Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. *FEBS Lett.* 2005; 579: 2203-2207

Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood.* 2002; 100: 4372-4380

Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 624-633

Fuchs M, Greil R, Naumann R, Engert A, 2012: Hodgkin Lymphome. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/hodgkin-lymphome> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Garcia-Manero G, Gore SD, Vogle CR. Evaluation of oral azacitidine using extended treatment schedules: a phase I study. *Blood (ASH Annual Meeting)* 2010; 116: Abstract 603

Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis and treatment. *Dtsch Ärztebl Int.* 2013; 110: 783-790

Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33: 2989-2996

Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguiar V, Di Sauro A, Sette C, Behr R, Kimmins S. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2007; 77: 754-764

Gökbuget N, Hauswirth AW, Kneba M, Schanz U, Ottmann O, 2012: Akute lymphatische Leukämie. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/akute-lymphatische-leukaemie> (Zugriffsdatum: 24.10.2014)

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007; 128: 635-638

Grießhammer M, Petrides PE, Baerlocher GM, Gisslinger H, Lengfelder E, 2014: Primäre Myelofibrose. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/primaere-myelofibrose-pmf> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Ott G, Nathwani BN, de Jong D, Yoshino T, Spagnolo D. Follicular lymphoma. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 220-226

Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, Ciceri F, Blaser JG, Greystoke BF, Jordan AM, Miller CJ, Ogilvie DJ, Somerville TC. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell.* 2012; 21: 473-487

Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M: Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007; 370: 342-50

Herold G. Erkrankungen der weißen Blutzellen und der blutbildenden Organe. In: Herold G, ed. *Innere Medizin.* Köln: Herold, 2013a: 60-107

Herold G. Internistische Tumorthherapie. In: Herold G, ed. *Innere Medizin.* Köln: Herold, 2013b: 108-117

Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med.* 2004; 10: 500-507

Hochaus A, Baerlocher G , Brümmendorf TH, Chalandon Y, Le Coutre P, Dölken G, Thiede C, Wolf D, 2013: Chronisch myeloische Leukämie. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cml> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Hofmann WK, Platzbecker U, Götze K, Stauder R, Passweg J, Germing U, 2013: Myelodysplastische Syndrome. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/mds> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; 253: 49-53

Hu X, Li X, Valverde K, Fu X, Noguchi C, Qiu Y, Huang S. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 10141-10146

Huang J, Fan T, Yan Q, Zhu H, Fox S, Issaq HJ, Best L, Gangi L, Munroe D, Muegge K. Lsh, an epigenetic guardian of repetitive elements. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 5019-5028

Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature.* 2007; 449: 105-108

Iannitto E, Ferreri AJ, Minardi V, Tripodo C, Kreipe HH. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008; 68: 264-271

Isaacson PG, Chott A, Nakamura S, Müller-Hermelink HL, Harris NL, Swerdlow SH. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 214-217

Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. FEBS Lett. 2009; 583: 1713-1720

Jabbour E, Garcia-Manero G. Deacetylase Inhibitors for the Treatment of Myelodysplastic Syndromes. Leuk Lymphoma. 2014: 1-26

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 158-166

Janzer A, Lim S, Fronhoffs F, Niazy N, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylase 1 (HDAC1) synergistically repress proinflammatory cytokines and classical complement pathway components. Biochem Biophys Res Commun. 2012; 421: 665-670

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001; 293: 1074-1080

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007; 128: 683-692

Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, Wolf S, Friedrichs N, Vorreuther R, Solleder G, Bastian PJ, Ellinger J, Metzger E, Schule R, Buettner R. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. Cancer Res. 2006; 66: 11341-11347

Kashyap V, Ahmad S, Nilsson EM, Helczynski L, Kenna S, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. The lysine specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) regulates VEGF-A expression in prostate cancer. Mol Oncol. 2013; 7: 555-566

Kerenyi MA, Shao Z, Hsu YJ, Guo G, Luc S, O'Brien K, Fujiwara Y, Peng C, Nguyen M, Orkin SH. Histone demethylase Lsd1 represses hematopoietic stem and progenitor cell signatures during blood cell maturation. *Elife*. 2013; 2: e00633

Khristi J, Mey U, Kirfel J, Schmidt-Wolf IG, Gütgemann I. Sequential Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma in non-immunocompromised patients. *Ann Hematol*. 2013; 92: 1565-1567

Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 823-833

Koch P, Eich HT, Bargetzi M, Buske C, Dreyling M, Klapper W, Raderer M, Reinartz G, Steurer M, Wörmann B J, 2012: Extranodales Marginalzonenlymphom. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/extranodales-marginalzonen-lymphom-mzol> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Kreuzer KA, Bettelheim P, Rosenwald A, Haferlach T, 2014: Hämatologische Diagnostik. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/haematologische-diagnostik> (Zugriffsdatum 03.11.2014)

Kühnl A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol*. 2012; 96: 153-163

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358: 15-16

Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, McCafferty DG, Shiekhattar R. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*. 2006; 13: 563-567

Lengfelder E, Baerlocher GM, Gisslinger H, Petrides PE, Grieshammer M, 2014: Polycythaemia Vera.

<https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/polycythaemia-vera-pv>

(Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Leoncini L, Raphael M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt lymphoma. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 262-264

Lim S, 2009. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1): A novel molecular target for tumor therapy. <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2009/1956/1956.pdf> (Zugriffsdatum: 05.10.2014)

Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schule R, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 512-520

Lokken AA, Zeleznik-Le NJ. Breaking the LSD1/KDM1A addiction: therapeutic targeting of the epigenetic modifier in AML. *Cancer Cell*. 2012; 21: 451-453

Loo E, Siddiqi IN. Processing the Lymph Node Biopsy. *Methods in Mol Biol*. 2014; 1180: 271-282

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389: 251-260

Lv T, Yuan D, Miao X, Lv Y, Zhan P, Shen X, Song Y. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012; 7: e35065

Lynch JT, Cockerill MJ, Hitchin JR, Wiseman DH, Somerville TC. CD86 expression as a surrogate cellular biomarker for pharmacological inhibition of the histone demethylase lysine-specific demethylase 1. *Anal Biochem*. 2013; 442: 104-106

Lynch JT, Harris WJ, Somervaille TC. LSD1 inhibition: a therapeutic strategy in cancer? *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 16: 1239-1249

Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15: 163-176

McCabe MT, Creasy CL. EZH2 as a potential target in cancer therapy. *Epigenomics*. 2014; 6: 341-351

Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 441-453

Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Muller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz-Huss C, Gunther T, Buettner R, Schule R. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature*. 2010; 464: 792-796

Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. 2005; 437: 436-439

Mosammaparast N, Kim H, Laurent B, Zhao Y, Lim HJ, Majid MC, Dango S, Luo Y, Hempel K, Sowa ME, Gygi SP, Steen H, Harper JW, Yankner B, Shi Y. The histone demethylase LSD1/KDM1A promotes the DNA damage response. *J Cell Biol*. 2013; 203: 457-470

Mosammaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem*. 2010; 79: 155-179

Muegge K. Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements. *Biochem Cell Biol*. 2005; 83: 548-554

Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Campo E, Harris NL, Stein H. Chronic lymphocytic/small lymphocytic lymphoma. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 180-182

Murray-Stewart T, Woster PM, Casero RA, Jr. The re-expression of the epigenetically silenced e-cadherin gene by a polyamine analogue lysine-specific demethylase-1 (LSD1) inhibitor in human acute myeloid leukemia cell lines. *Amino Acids*. 2014; 46: 585-594

National Library of Medicine, 2014a: A First-in-Human Phase 1 and Expanded Cohort Study of EPZ-5676 in Advanced Hematologic Malignancies, Including Acute Leukemia With Rearrangement of the MLL Gene.

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01684150?term=mll1&rank=1> (Zugriffsdatum: 23.10.2014)

National Library of Medicine, 2014b: A Phase I Dose Escalation Study for GSK2879552 in Subjects With Acute Myeloid Leukemia (AML).

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02177812?term=lsd1+inhibitor&rank=2>
(Zugriffsdatum: 22.10.2014)

National Library of Medicine, 2014c: Investigation of GSK2879552 in Subjects With Relapsed/Refractory Small Cell Lung Carcinoma.

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034123?term=lsd1+inhibitor&rank=1>
(Zugriffsdatum: 22.10.2014)

National Library of Medicine, 2014d: Phase I/II Trial of ATRA and TCP in Patients With Relapsed or Refractory AML and no Intensive Treatment is Possible (TCP-AML).

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02261779?term=lsd1+inhibitor&rank=3>
(Zugriffsdatum: 22.10.2014)

Nicholson TB, Chen T. LSD1 demethylates histone and non-histone proteins. *Epigenetics*. 2009; 4: 129-132

Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 692-702

Orazi A. Histopathology in the Diagnosis and Classification of Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplastic Syndromes, and Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases. *Pathobiology.* 2007; 74: 97-114

Orazi A, Bennet JM, Germing U, Brunning RD, Bain BJ, Thiele J. Chronic myelomonocytic leukaemia. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 76-79

Ott CJ, Kopp N, Bird L, Paranal RM, Qi J, Bowman T, Rodig SJ, Kung AL, Bradner JE, Weinstock DM. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012; 120: 2843-2852

Pearson H. Genetics: what is a gene? *Nature.* 2006; 441: 398-401

Petrides PE, Grießhammer M, Lengfelder E, Baerlocher G, Gisslinger H, 2014: Essentielle (oder primäre) Thrombozythämie.
<https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/essentielle-oder-primare-thrombozythaemie-et> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Pileri SA, Weisenburger DD, Sing I, Jaffe ES, Ralfkiaer E, Nakamura S, Müller-Hermelink HK. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 306-308

Pilla D, Bosisio FM, Marotta R, Faggi S, Forlani P, Falavigna M, Biunno I, Martella E, De Blasio P, Borghesi S, Cattoretti G. Tissue microarray design and construction for scientific, industrial and diagnostic use. *J Pathol Inform.* 2012; 3: 42

Quintanilla-Martinez L, Tinguely M, Bonzheim I, Fend F. Knochenmarkbiopsie. *Pathologe*. 2012; 33: 481-489

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Nukleinsäuren. In: Bob A, Bob K eds. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme, 2008: 428-432

Rodriguez J, Gutierrez A, Martinez-Delgado B, Perez-Manga G. Current and future aggressive peripheral T-cell lymphoma treatment paradigms, biological features and therapeutic molecular targets. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 71: 181-198

Rotili D, Tomassi S, Conte M, Benedetti R, Tortorici M, Ciossani G, Valente S, Marrocco B, Labella D, Novellino E, Mattevi A, Altucci L, Tumber A, Yapp C, King ON, Hopkinson RJ, Kawamura A, Schofield CJ, Mai A. Pan-histone demethylase inhibitors simultaneously targeting Jumonji C and lysine-specific demethylases display high anticancer activities. *J Med Chem*. 2014; 57: 42-55

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 983-994

Saleque S, Kim J, Rooke HM, Orkin SH. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell*. 2007; 27: 562-572

Schenk T, Chen WC, Gollner S, Howell L, Jin L, Hebestreit K, Klein HU, Popescu AC, Burnett A, Mills K, Casero RA, Jr., Marton L, Woster P, Minden MD, Dugas M, Wang JC, Dick JE, Muller-Tidow C, Petrie K, Zelent A. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2012; 18: 605-611

Schmidt DM, McCafferty DG. trans-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1. *Biochemistry*. 2007; 46: 4408-4416

Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005; 106: 3733-3739

Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schule R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res*. 2009; 69: 2065-2071

Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: a new mechanism of p53 tumor suppressor regulation. *Histol Histopathol*. 2008; 23: 1143-1149

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004; 119: 941-953

Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*. 2003; 422: 735-738

Shulman KI, Herrmann N, Walker SE. Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression. *CNS Drugs*. 2013; 27: 789-797

South AP, Cho RJ, Aster JC. The double-edged sword of Notch signaling in cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23: 458-464

Sprussel A, Schulte JH, Weber S, Necke M, Handschke K, Thor T, Pajtler KW, Schramm A, Konig K, Diehl L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, Jastrow H, Heukamp LC, Schule R, Duhrsen U, Buettner R, Eggert A, Gothert JR. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia*. 2012; 26: 2039-2051

Stein H. Hodgkin Lymphoma, Introduction. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 322

Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 233-237

Sun G, Alzayady K, Stewart R, Ye P, Yang S, Li W, Shi Y. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2010; 30: 1997-2005

Swerdlow SH, Campo E, Seto M, Müller-Hermelink HK. Mantle cell lymphoma. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008: 229-232

Theisen ER, Gajiwala S, Bearss J, Sorna V, Sharma S, Janat-Amsbury M. Reversible inhibition of lysine specific demethylase 1 is a novel anti-tumor strategy for poorly differentiated endometrial carcinoma. *BMC Cancer.* 2014; 14: 752

Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der WJ, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005; 90: 1128-1132

Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Tefferi A, Birgegard G. Polycythaemia Vera. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008a: 40-43

Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, Tefferi A, Gisslinger H. Essential thrombocythaemia. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008b: 48-50

Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A, Barosi G, Orazi A, Vardiman JW. Primary myelofibrosis. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008c: 44-47

Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, Bloomfield CD, Thiele J. Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008a: 18-30

Vardiman JW, Melo JV, Baccarani M, Thiele J. Chronic myelogenous leukaemia, BCR-ABL1 positive. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (4. Aufl.). Genf: WHO Press, 2008b: 32-37

Varier RA, Timmers HT. Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1815: 75-89

Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J*. 2012; 53: 359-369

Vu LP, Luciani L, Nimer SD. Histone-modifying enzymes: their role in the pathogenesis of acute leukemia and their therapeutic potential. *Int J Hematol*. 2013; 97: 198-209

Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*. 2009; 41: 125-129

Wang J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG, Kronen A, Ohgi KA, Zhu P, Garcia-Bassets I, Liu F, Taylor H, Lozach J, Jayes FL, Korach KS, Glass CK, Fu XD, Rosenfeld MG. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*. 2007; 446: 882-887

Wendtner CM, Dreger P, Gregor M, Greil R, Knauf WU, Schetelig J, Steurer M, Stilgenbauer S, 2012: Chronisch Lymphatische Leukämie. <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cll> (Zugriffsdatum: 27.10.2014)

Yang M, Culhane JC, Szewczuk LM, Jalili P, Ball HL, Machius M, Cole PA, Yu H. Structural basis for the inhibition of the LSD1 histone demethylase by the antidepressant trans-2-phenylcyclopropylamine. *Biochemistry*. 2007; 46: 8058-8065

Yatim A, Benne C, Sobhian B, Laurent-Chabalier S, Deas O, Judde JG, Lelievre JD, Levy Y, Benkirane M. NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol Cell*. 2012; 48: 445-458

Yin F, Lan R, Zhang X, Zhu L, Chen F, Xu Z, Liu Y, Ye T, Sun H, Lu F, Zhang H. LSD1 regulates pluripotency of embryonic stem/carcinoma cells through histone deacetylase 1-mediated deacetylation of histone H4 at lysine 16. *Mol Cell Biol*. 2014; 34: 158-179

Yu Y, Wang B, Zhang K, Lei Z, Guo Y, Xiao H, Wang J, Fan L, Lan C, Wei Y, Ma Q, Lin L, Mao C, Yang X, Chen X, Li Y, Bai Y, Chen D. High expression of lysine-specific demethylase 1 correlates with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437: 192-198

Zhao ZK, Dong P, Gu J, Chen L, Zhuang M, Lu WJ, Wang DR, Liu YB. Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma. *Tumour Biol*. 2013; 34: 173-180

Zhou C, Kang D, Xu Y, Zhang L, Zha X. Identification of Novel Selective Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors Using a Pharmacophore Based Virtual Screening Combined with Docking. *Chem Biol Drug Des*. 2014; Ahead of Print

10. Danksagung

PD Dr. med. Ines Gütgemann danke ich für die tolle Betreuung. Mit sehr viel Geduld stand sie mir bei Fragen zu jedem Zeitpunkt des Dissertationsvorhabens freundlich zur Seite. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, einen Einblick in die Forschung auf diesem Gebiet erhalten zu haben.

PD Dr. rer. nat. Jutta Kirfel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die konstruktive Kritik zum Manuskript der Publikation.

Susanne Steiner danke ich für die Anfertigung und Wiederholung zahlreicher immunhistochemischer Schnitte und die vielen netten Worte.

Jennifer Khristi danke ich für die Überlassung des Lymphom TMAs und die freundliche Einarbeitung.

Seher Aktekin danke ich für die Anfertigung der TMAs und die freundliche Einweisung in die Technik.

Dr. med. Viktor Janzen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Hinweise aus der klinischen Praxis.

Tobias Höller danke ich für die gute Zusammenarbeit in der Durchführung der statistischen Tests.

PD Dr. med. Michael Majores danke ich für die geleistete Vorarbeit im Anfertigen von LSD1-Knochenmarkfärbungen.

Ich danke besonders meiner Familie, die das Wichtigste in meinem Leben ist.

Ich danke allen Menschen, die mir nahe stehen oder einmal standen.