

AUS DER KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND
KLINISCHE IMMUNOLOGIE DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

(Direktor: Prof. Dr. med. R. Haas)

**Immunphänotypische Charakterisierung von Patienten
mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) oder
akuter monozytär differenzierter Leukämie (AML)**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf

vorgelegt von

Angelika Neuenfeld

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. U. Germing

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Borkhardt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
A. MDS, Klassifikation.....	6
1.1.1 Tabelle 1: FAB – Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome.....	6
1.1.2 Tabelle 2: minimale diagnostische Kriterien der MDS.....	7
1.1.3 Tabelle 3: International Prognostic Scoring System (IPSS).....	8
1.1.4 Ergänzende Untersuchungsmethoden: FISH, HUMARA, Immunhistologie.....	9-11
B. CMML, Klassifikation.....	12
1.2.1 Tabelle 4: WHO-Klassifikation der CMML.....	13
Diagnostische Kriterien der CMML.....	14
C. AML, Klassifikation.....	14
1.3.1 Tabelle 5: Diagnostische Kriterien der WHO-Klassifikation bei der AML.....	15
1.3.2 Tabelle 6: FAB – Klassifikation der AML mittels zytologischer Kriterien.....	16
1.3.3 Tabelle 7: Genveränderungen bei AML-Patienten.....	18
1.3.3 Tabelle 8: Punktmutation der AML.....	19
1.3.4 Tabelle 9: Mutation der CMML und AML.....	20
1.3.5 Tabelle 10: Punktmutation der Tyrosinkinase bei der FAB-klassifizierten AML.....	21
1.3.5 Tabelle 11: Punktmutation innerhalb der Tyrosinkinase.....	21
1.3.6 Tabelle 12: Verteilung der N-RAS-Mutation der AML-Typen.....	22
2. Zielsetzung	23
3. Methoden	24
3.1 Immunzytologische Untersuchung.....	25
3.2 Untersuchungsmaterial.....	26
3.3 Thymidinkinasebestimmung im Serum.....	26

3.4 Lysozymkonzentration im Serum.....	27
3.5 Zytochemische Färbung.....	27
3.6 Klinische Routineuntersuchung.....	27
3.7 Serologische Routineuntersuchung.....	28
3.8 Statistische Methoden.....	28
3.9 Antigenmarker verschiedener Zellreihen: Tabelle 1: CD – Expression der monozytären und granulopoetischen Zellpopulation.....	29
3.10 Tabelle 2: zelluläre Expression und Funktion von zellulären Oberflächenantigenen....	30
4. Ergebnisse.....	32
4.1 Tab.1: klinische Parameter.....	32
4.2 Prognoseparameter bei CMML.....	34
4.2.1 Abb.1: Kaplan Meier Plot des kumulativen Risikos der AML Entwicklung bei Patienten mit CMML.....	34
4.2.2 Abb.2: Kaplan Meier Plots des kumulativen Überlebens von CMML –Patienten.....	35
4.2.3 Tab.2: CMML: Krankheitsverlauf (Überlebenszeit und AML-Übergang) anhand des Düsseldorfer MDS-Registers.....	36
4.2.4 Tab.3: Parameter für CMML-Patienten in den unterschiedlichen Scoring-Systemen...	37
4.2.5 Tab.4: Genaue Definitionen der 4 CMML Prognose-Scores.....	38
4.2.6 Tab.5:Überlebenszeit und AML-Übergang der CMML-Patienten in Übereinstimmung der unterschiedlichen Scores, anhand des MDS-Registers Düsseldorf.....	39
4.3 Immunphänotypisierung bei CMML und AML.....	42
4.3.1 Immunphänotypisierung bei CMML.....	42
4.3.1.1 Abb.1: Antigene der CMML.....	43
4.3.1.2 Abb.2: Antigene der CMML.....	44
4.3.2 Immunphänotypisierung bei AML.....	46

4.3.2.1	Abb.1: Antigene der AML Typ 4 und 5.....	46
4.3.2.2	Abb.2: Antigene der AML Typ 4 und 5.....	47
4.3.3.1	Abb.1: Antigenexpressionen der CMML und AML im Vergleich	48
4.3.3.1	Abb.2: Signifikanz der Antigene bei der CMML und AML.....	49
5.	Diskussion.....	50
5.1.	Tab.1: Kriterien der Scoring-Systeme	54
6.	Literaturverzeichnis.....	56
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	66
8.	Lebenslauf.....	70
9.	Zusammenfassung.....	71

1. Einleitung

A.

MDS

Die myelodysplastischen Syndrome sind eine vielfältige Gruppe von Stammzellerkrankungen, die durch gesteigerte Apoptose, gestörte Ausreifung, klonale Evolution mit Blastenexpansion und gesteigerte Proliferation gekennzeichnet sind. Diese Mechanismen führen meist zur peripheren Zytopenie. Die zytomorphologische Einteilung geschieht nach Ausmaß der Blasten, dem Nachweis von Ringsideroblasten und dem Nachweis von Monozyten im Blut.

1.1.1Tabelle 1: FAB – Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome

FAB-Gruppe	Blastenanteil im Blut %	Blastenanteil im KM %	Weitere Veränderung
RA	<1	<5	
RARS	<1	<5	>15% Ringsideroblasten
RAEB	<5	5 – 20	
RAEB – T	>5	20 – 29	Fakultative Auerstäbchen
CMML	<5	<20	Periphere Monozytose (>1000/ μ l)

Eine standardisierte Diagnostik wurde 2006 für die MDS-Formen von einer internationalen Arbeitsgruppe in Wien erstellt. (33) Hierbei wird die MDS nach A-, B-, C –Kriterien differenziert. (1.1.2 Tab.2)

1.1.2Tabelle 2: minimale diagnostische Kriterien der MDS

A-Kriterien erforderliche Kriterien	Konstante Zytopenie in einer oder mehrer folgender Zellabstammungen: leukozytär: neutrophile Leukozyten: <1500/ μ l erythrozytär: Hb < 11g%, thrombozytär: Thrombozyten:<100000/ μ l Ausschluss aller anderen hämatopoetischer oder nicht-hämatopoetischer Erkrankungen als vorrangigen Grund der Zytopenie bzw. Dysplasie.
B-Kriterien MDS ähnliche ausschlaggebende Kriterien	Dysplasien in mindestens 10% aller Zellen in einer der folgenden Zellabstammungen im Knochenmarkausstrich : leukozytär, erythrozytär, thrombozytär oder <15% Ringsideroblasten 5-19% Blasten im Knochenmarkausstrich typische Chromosomenanomalien, nachgewiesen durch eine normale Karyotypisierung oder FISH
C-Kriterien Co-Kriterien für Patienten, die weder A- noch B-Kriterien erfüllen, z.B. makrozytäre transfusionsabhängige Anämie	Anormale Phänotypen der Knochenmarkzellen, die monoklonale Populationen von erythrozytären und/oder myelozytären Zellen, zeigen, nachgewiesen durch Durchflußzytometrie. Deutliche molekulare Zeichen, von monoklonalen Zellpopulationen in HUMARA-Assay, Gen-chip-profiling oder Punkt-Mutations-Analyse. Deutliche und dauerhafte Reduktion von Kolonieformationen im Knochenmarkausstrichen und/oder zirkulierenden Progenitorzellen.

Die in der Arbeit aufgeführten immunphänotypischen Daten wurden in einer Zeit der Ergänzung der immunphänotypischen Charakterisierung zur Zytomorphologie erstellt. Heute werden zyto- und histomorphologische Untersuchungsmethoden durch zytochemische und immunphänotypische Methoden unterstützt, um eine genaue Diagnose zu erreichen. Ergänzend wird auch eine Chromosomenanalyse mit Bänderungstechnik, aber auch in Form der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH) eingesetzt, die die Diagnostik vervollständigen. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungsmethoden schwankt zwischen 56%-90%.
(41)

Die Prognose der Patienten ist sehr unterschiedlich und ist unter anderem davon abhängig, wie ausgedehnt der Blastenanteil ist, und ob eine oder mehrere Zellreihen im Blut vermindert

sind. Darüber hinaus spielt der Chromosomensatz eine Rolle bei der Abschätzung der Prognose. 1997 ist das International Prognostic Scoring System (IPSS) eingeführt worden. Inzwischen ist es zum Gold-Standard geworden, um Patienten mit der primären MDS prognostisch einzuordnen.

Hier werden unter Berücksichtigung von drei Risikomerkmale (1.1.3 Tab. 3) vier Prognose-Gruppen (niedriges Risiko, intermediäres Risiko I, intermediäres Risiko II und hohes Risiko) unterschieden. Mit diesem Score sind Vorhersagen des natürlichen Krankheitsverlaufes (Überlebenszeit und Wahrscheinlichkeit des Leukämierisikos) möglich. (Niedriges Risiko: Score 0 (5,7 Jahre); Intermediäres Risiko 1: Score 0,5-1,0 (3,5 Jahre); Intermediäres Risiko 2: Score 1,5-2 (1,2 Jahre); Hohes Risiko: Score \geq 2,5 (0,4 Jahre) (46)

1.1.3.Tabelle 3: International Prognostic Scoring System (IPSS) (46)

Prognostische Variable	Score 0	Score 0,5	Score 1,0	Score 1,5	Score 2,0
Blasten (KM)	<5%	5-10%	-	11-20%	21-30%
Karyotyp	Günstig normal, -Y, 5q- 20q-	Intermediär andere Chromosomenver- änderungen	Ungünstig komplexe (\geq 3 Chromosomenveränderungen), oder Chromosom 7Veränderungen		
Zytopenien	0/1	2/3			

1.FISH

Die Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularpathologische Weiterentwicklung der histologischen Diagnostik. Dabei wird DNA-Material aus histologischen Geweben gelöst oder aus frischem Zellmaterial aus dem Knochenmark separiert.

Genveränderungen werden in folgenden Regionen erfasst: (34)

5q31 (Monosomie 5 Deletion 5q-)

CEP7 (Monosomie 7 Deletion 7q-)

7q31, CEP8 (Trisomie 8)

20q (Deletion 20q-)

CEPY (Verlust des Y-Chromosoms (-Y))

p53 (Deletion 17p13 (p53-Deletion))

2. HUMARA

Die Klonalitätsanalyse (HUMARA) besteht in der Untersuchung des Inaktivierungsmusters von X-Chromosomen-gekoppelten Genloci. Diese Methode basiert auf den folgenden drei Prinzipien, wie sie von Vogelstein 1985 definiert wurden:

- a. Nur eines der X-Chromosomen in jeder weiblichen Zelle ist aktiv, diese Aktivierung tritt zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese auf und wird in der Folge stabil an alle Nachfahren dieser Zellen weitergegeben.
- b. Die Aktivierung der meisten Gene ist begleitet von Veränderungen in der Methylierung von Cytosin-Resten der DNA.
- c. Die mütterlichen und väterlichen Kopien der X-Chromosomen können auf DNA-Ebene unterschieden werden, z.B. durch das Vorliegen von Gen-Polymorphismen.

Definitionsgemäß werden Zellen, die durch mitotische Zellteilung aus einer einzigen somatischen Vorläuferzelle hervorgegangen sind, als klonale Zellpopulation bezeichnet.

Der weibliche Zellverband ist also in der Regel eine Mischung von Zellen, die jeweils zufällig entweder das mütterliche oder väterliche X-Chromosom aktiviert enthalten. Jede Zelle gibt ihr spezifisches Inaktivierungsmuster jeweils an alle nachkommenden Zellen weiter. Monoklonale Tumoren dagegen bestehen aus Zellen, die alle aus einer Ursprungszelle hervorgegangen sind, und in denen somit jeweils immer dasselbe mütterliche oder väterliche X-Chromosom inaktiviert vorliegt, wie in ihrer Ursprungszelle. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese X-Chromosomen-Inaktivierung mit der Methylierung von Cytosinresten in Bereichen sog. „CpG-Islands“ in der DNA der X-chromosomalen Gene zusammenhängt. Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine chemische Abänderung an Grundbausteinen der Erbsubstanz einer Zelle. Diese Modifikation wird durch die Übertragung von Methylgruppen durch Enzyme auf Nukleobasen an bestimmten Stellen innerhalb der DNA hervorgerufen. Diese Inaktivierung wird wahrscheinlich durch ein Inaktivierungszentrum des X-Chromosoms gesteuert. Dabei liegt das inaktivierte X-Chromosom methyliert vor, das aktivierte X-Chromosom bleibt unmethyliert. Diesen Unterschied kann man für die Klonalitätsanalyse nutzen. Durch methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen kann die DNA selektiv (nur die nicht-methylierten Abschnitte) geschnitten werden. Inaktivierte (also methylierte) X-Chromosomen können so durch das spezifische Schnittmuster von aktivierten (also unmethylierten) X-Chromosomen unterschieden werden. Mittels PCR-Analyse kann im Folgenden dann das nicht-geschnittene (also inaktivierte) X-Chromosom amplifiziert und mittels Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden.

Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, muss jedoch neben dem weiblichen Status eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Die untersuchte Patientin muss heterozygot sein für den eingesetzten X-chromosomal-gekoppelten Polymorphismus, d.h. der zu untersuchende maternale und der paternale Genabschnitt des X-Chromosoms liegt in zwei verschiedenen Allelen vor. Eine hohe Heterozygotierate liegt dabei für das Humane Androgenrezeptor-Gen (HUMARA) vor.

3. Immunhistochemische Untersuchungsmethoden

Mittels Durchflußzytometrie können myeloische Zellen charakterisiert bestimmt werden:

HLA-CR, HLA-DR, CD 5, CD 7, CD 11b, CD 13, CD 14, CD 15, CD 16, CD 19, CD 33, CD 34, CD 38, CD 45, CD 56. (40)

Immunhistochemisch wird ein Suchtest mit den immunphänotypischen Markern CD 34, CD 31 (oder CD 42, CD 62) und Tryptase angesetzt. In schwierigen Differenzierungsfällen können ergänzende Ansätze mit CD 3, CD 15, CD 38, CD 20, CD 25, CD 117, CD 68, CD 68R, 2D7, BB1 und Lysozym erfolgen.

Oftmals geht eine Antikörperbildung gegen CD 34 mit einer Darstellung der atypischen Lokalisation von unreifen Vorstufen (ALPC) einher. In neueren Untersuchungen wurde versucht, die Durchflußzytometrie zur Charakterisierung der MDS zu nutzen, und dass ähnliche CD-Muster äquivalente Krankheitsverläufe zeigen. (29, 35, 36, 37, 47)

Loken et al. (43) bestätigt in seinem Report, dass die Durchflußzytometrie die Myeloblasten durch die Antigendarstellung erfasst, die pathologischen Myeloblasten identifiziert, den Übergang der reifen Myelozyten und Monozyten darstellt, und eine quantitative Aussage von den Veränderungen der Myelo- und Monozyten ermöglicht.

B.

CMML

Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), ein Subtyp der Myelodysplastischen Syndrome, ist eine seltene (1,8 – 2,4 % aller Leukämien (1)) erworbene Knochenmarkerkrankung, die durch Vermehrung monozytärer Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut charakterisiert ist und in unterschiedlichem Ausmaß Dysplasiezeichen der Knochenmark- und Blutzellen sowie eine Vermehrung von Blasten aufweisen kann. 1982 wurde die CMML als ein Subtyp der myelodysplastischen Syndrome (MDS) klassifiziert (1.1.1 Tab. 1). Der natürliche und klinische Krankheitsverlauf gestaltet sich sehr variabel, sodass eine weitere Klassifizierung der FAB-Gruppe (French–American–British-Group) 1994 vorgeschlagen wurde: MDS-CMML für eine dysplastische Form der CMML und MPD-CMML für eine proliferative Verlaufsform der CMML. Hierbei war die periphere Leukozytenanzahl entscheidend:

$\geq 13.000/\mu\text{l}$ für die MPD-CMML und $< 13.000/\mu\text{l}$ für die MDS-CMML (2). Die eher proliferative Variante ist gekennzeichnet durch Organomegalie und erinnert an eine chronische myeloische Leukämie, während die dysplastische Variante Charakteristika eines myelodysplastischen Syndroms vom Typ RAEB mit Thrombozytopenie und Anämie aufweist und sich nur durch den Nachweis der Monozytose von dieser unterscheidet. Eine weitere Unterteilung der CMML, die in Abhängigkeit von den peripheren und medullären Blastenteilen erfolgt, ist von der WHO vorgeschlagen worden (20). (1.2.4 Tab. 4). Etwa die Hälfte der CMML-Diagnosen wird anlässlich einer Routineblutbilduntersuchung gestellt, bei der Zytopenien und meist eine Leukozytose bzw. Monozytose auffällig ist. Symptome der Knochenmarkinsuffizienz, ineffektive Hämatopoese mit intramedullärer Apoptose, wie Anämiesymptome, rezidivierende Infekte und hämorrhagische Diathese stehen im Vordergrund. Seltener sind Organomegalien, Lymphknotenschwellungen, Gingivahyperplasien und andere extramedulläre Krankheitsmanifestationen. Zur Diagnostik

der CMML sind Blutuntersuchungen mit Differenzialblutbild, klinische Diagnostik, Knochenmarkhistologie und –zytologie und eine Chromosomenanalyse erforderlich. Ein weiteres diagnostisches Instrument könnte die Immunphänotypisierung von Knochenmarkzellen von CMML-Patienten darstellen. (3)

Bei der CMML wird, wie bei allen anderen MDS-Typisierungen, eine Mehrschrittpathogenese der malignen Entartung diskutiert. Die neoplastisch geschädigte Zelle scheint die unreife myeloisch differenzierte Stammzelle zu sein, da die CMML fast ausschließlich in akute myeloische Leukämie und nur selten in lymphatische Formen übergeht.

Auch eine Beteiligung aller drei Zellreihen unterstützt die These einer Schädigung der gering differenzierten hämatopoetischen Stammzelle. Die Genese der neoplastischen Transformation ist noch ungeklärt, jedoch sind chromosomale Aberrationen in 20-50% der Fälle nachweisbar, die die fehlgesteuerte Hämatopoese begünstigt (10).

Ebenso sind vereinzelt molekulare Defekte, z.B. RAS-Onkogenmutationen und Inaktivierung vom Tumorsupressorgen p53 nachgewiesen worden. Hinweise für eine klonale Weiterentwicklung sind Übergänge in die AML, die oftmals mit zusätzlichen chromosomalen Defekten begleitet werden.

1.2.1 Tabelle 4: WHO-Klassifikation der CMML

	Knochenmark	peripheres Blut
CMML1	<10% Blasten	<5% Blasten
CMML2	<20% Blasten	<20% Blasten

Diagnostische Kriterien der CMML:

1. persistierende Monozytenzahl $>1 \times 10^9/l$ im peripheren Blut
2. kein Philadelphia-Chromosom oder BCR/ABL Genfusion nachweisbar
3. weniger als 20% Blastenanteil im peripheren Blut oder im Knochenmark
4. Dysplasien in einer oder mehrerer myeloischer Vorstufen. Falls eine myeloische Dysplasie fehlt oder nur minimal ausgeprägt ist, ist die Diagnostik der CMML nur durch andere Forderungen möglich:
 - klonale zytogenetische Abnormitäten sind auf den Knochenmarkszellen vorhanden, oder:
 - über 3 Monate bestehende Monozytose und:
 - alle anderen Differentialdiagnosen einer Monozytose sind ausgeschlossen worden.

C.

AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine erworbene Erkrankung des hämatopoetischen Systems mit einer Inzidenz von 1-2/100000 Einwohner /Jahr (4). Bei AML kann man eine primäre (de novo AML) und sekundäre Form (s-AML) unterscheiden.

Eine neue Einteilung durch die WHO berücksichtigt die zytogenetischen Befunde bei der AML.

1.3.1 Tabelle 5: Diagnostische Kriterien der WHO-Klassifikation bei der AML

1. typische genetische Veränderung
 - a. t(8;21)(q22;q22);(AML1CBFa)/ETO)
 - b. inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(p13;q22);(CBFb/MYH), abnormale Eosinophile im Knochenmark
 - c. t(15;17)(q22;q12) (PML/RARa) und deren Varianten
 - d. 11q23(MLL) Abnormitäten
2. mit > 50% dysplastischen Zellen der Granulopoese, Thrombopoese und Erythropoese
3. therapiebedingte myelodysplastische Syndrome und AML
4. nicht anders zuzuordnende AML
 - a. minimal differenzierte AML
 - b. AML ohne Zelldifferenzierung
 - c. AML mit Zelldifferenzierung
 - d. AMML
 - e. akute monoblastische monozytische Leukämie
 - f. akute erythroide Leukämie
 - g. akute megakaryoblastische Leukämie
 - h. akute basophile Leukämie
 - i. akute Störung der Knochenmarkfunktion mit Knochenmarkfibrose
 - j. Knochenmarksarkom
5. akute Leukämie mit unklarem Ursprung
 - a. undifferenzierte akute Leukämie
 - b. biphänotypisch akute Leukämie, bezogen auf den Genotyp
 - c. bilineäre akute Leukämie

1.3.2 Tabelle 6: FAB – Klassifikation der AML mittels zytologischer Kriterien

FAB – Subtyp	Zytologische Kriterien
M0 Minimal differenzierte Myeloblastenleukämie	<3% aller Blasten POX – positiv; CD 33 u./o. CD 13, CD 34, HLA-DR evtl., CD 11b positiv, lymphatische B- oder T – Linien – Marker negativ.
M1 Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung	Kleine ungranulierte Blasten coexprimieren CD 13 u./o. CD 33, meistens CD 34 HLA – DR Reife myeloische Antigene sind meist negativ, MPO positiv. Keine Abberationen. Coexpression von CD 7 gilt als schlechtes Prognosezeichen Zellkern: ein oder mehrere Nukleolen abgrenzbar Zytoplasma: vereinzelt Azurgranula u./o. Auerstäbchen >3% der Blasten POX positiv, 90% aller nicht erythropoetischen Zellen sind Blasten
M 2 Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	Weitgehende Ausreifung der leukämischen Blasten > 10% der kernhaltigen Zellen sind Myelozyten oder Promyelozyten, teilweise Übergänge bis zu reifen Granulozyten, häufig Auerstäbchen. 30 – 89% aller nicht erythropoetischen Zellen sind Blasten. CD 13, CD 33, HLA-DR positiv, meist auch CD 15, CD 65 nicht immer CD 34 t(8;21) coexprimiert CD 56, häufig CD 19
M3 Promyelozytenleukämie	Zellkern häufig nierenförmig oder bilobulär Zytoplasma fast vollständig ausgefüllt mit grober Granula, vereinzelt Faggot- Zellen mit bündelförmiger Anordnung von Auerstäbchen und klarem Zytoplasma CD 13, CD 33 positiv, HLA- DR negativ, CD 34, CD 65, CD 15 variabel Evtl. CD 2 positiv
M4 Monozytenleukämie	Anteil granulozytärer Zellen nicht < 10%, max. 20% Markerenzym POX; monozytäre Zellen >80% aller nichterythropoetischen Zellen , Markerenzym für monozytäre Zellen: unspezifische Esterase
M5a undifferenziert	Große Monoblasten im Knochenmark, selten auch im Blut, stark aufgelockertes Chromatingerüst mit einem oder mehreren prominenten Nukleoli, Zytoplasma sehr voluminös, basophil, teilweise Pseudopodien, vereinzelt Azurgranula, vereinzelt Auerstäbchen, > 80% aller monozytärer Zellen sind Blasten, Antigenexpression entspricht M1 o. M2 ohne t(8;21)

FAB – Subtyp	Zytologische Kriterien
M5b differenziert	Ausreifung der Monoblasten über Promonozyten bis hin zu reifen Monozyten , der periphere Monozytenanteil ist höher als im KM, Zellkerne stark gelappt, Zytoplasma grau, häufig Azurgranula, vereinzelt Auerstäbchen, weniger als 80% monozytärer Zellen sind Blasten CD 64, CD 14 positiv, mit beginnender monozytärer Differenzierung wird auf den Blasten CD 4 coexprimiert
M6 Erythroleukämie	Anteil erythropoetischer Zellen mit schweren Kernreifungsstörungen >30%, Erythropoese häufig PAS positiv, Myeloblastenanteil >30 % aller nicht erythropoetischen Zellen im KM Unspezifische Markererkennung von CD 34, CD 71 Glykophorin A nur auf reifen erythrozytären Zellen
M7 Megakaryoblastenleukämie	Bei Faservermehrung im KM meist punctio sicca, Blasten zeigen starke Anisozytose, teilweise lymphoide Morphologie, POX negativ, Diagnosesicherung: elektronenmikroskopischer Nachweis der Plättchenperoxidase oder immunologischer Nachweis von Glykoprotein IIb/IIIa CD 41, CD 61, HLA-DR, CD 13, CD 33, CD 7 können positiv sein. Trisomie 21, Translokation t (1;21) und inv (3) wurden beschrieben

Zytomorphologisch wird die AML nach der FAB-Klassifikation differenziert (1.3.2. Tab. 6), zudem kann unter Berücksichtigung der chromosomalen Befunde und der anamnestischen Angaben die Klassifikation der WHO angewendet werden (20). (1.3.1 Tab. 5) Zytostatische Behandlungen mit alkylierenden Substanzen können mit einer zeitlichen Verzögerung von Jahren zur Entstehung der s-AML führen (5, 6, 7). Ebenso können myeloproliferative Erkrankungen und insbesondere die myelodysplastischen Syndrome als Praelukämien der s-AML den Weg bereiten (8). Die monozytär differenzierten AML Typen M4 und M5 sind der CMML zum Teil ähnlich. Die monozytäre Differenzierung der Blasten, aber auch das Auftreten von reifen Monozyten, ist sowohl der AML M4 und M5 als auch den CMML zu eigen.

Der M 4 Typ = myelomonozytäre Leukämie ist zytologisch durch das Vorhandensein eines erhöhten Anteils von Monoblasten, Promonozyten und Monozyten im Blut ($\geq 5 \cdot 10^9/l$) oder im Knochenmark ($> 20\%$ aller kernhaltiger Zellen) gekennzeichnet. 30 – 80% ist der Anteil der granulopoetischen Zellen von allen nicht erythropoetischen Zellen (9). Der M 5 Typ = Monoblastenleukämie weist sich durch einen 10 – 20 %igen Anteil von granulozytären Zellen aus. Die monozytären Zellen machen $\geq 80\%$ der nicht erythrozytären Zellen aus. (9)

Neuere zytogenetische und molekulare Studien zeigen bei einigen Patienten mit myeloproliferativer Erkrankung die Existenz von zytogenetischen Anomalien. Mikro-Array-Analysen werden in letzter Zeit benutzt, um Genexpressionen darzustellen. Hierbei wird eine maximale Einsicht in die Genregulation und Genveränderung gegeben, sodass diese Methode in Zukunft andere Diagnostiken ersetzen wird.

Haferlach et al. (41) stellt in einer Untersuchung von 620 AML- Patienten folgende Genveränderungen dar:

1.3.3 Tabelle 7: Genveränderungen bei AML-Patienten

Genveränderung	Verteilung in Prozent	Spezifität in Prozent
t(15;17)	6,9%,	100%
t(8;21)	6,1%,	94,7%
inv(16)/t(16/16)	7,9%,	98%
t(11q23)	7,6%,	89,4%
Komplexe Aberration	12,1%,	88%
Andere Genveränderungen	28,3%	97,3%
normaler Karyotyp	31,1%.	93,7%

Generell zeigen AML-Patienten mit t(15;17), t(8;21) oder inv(16)/t(16/16) einen besseren Krankheitsverlauf als Patienten mit komplexen Aberrationen. (42, 45)

Core binding factor-Leukämie, eine Subform der AML, wird durch inv(16)/t(16/16) oder t(8;21) charakterisiert, bei der eine bessere Krankheitsprognose zu erwarten ist.

Die AML mit t(8;21) ist morphologisch mit dem FAB-Typ M 2 mit Auerstäbchen und die AML mit abn(16q22) mit dem FAB-Typ M 4 Eo assoziiert.

Auch Chillon (47) konnte vier verschiedene Genveränderungen quantitativ untersuchen:

Tabelle 8: Punktmutationen der AML

Genveränderung	Verteilung in Prozent
PML/RARalpha t (15;17)	34,5%
AML1/ETO t(8;21)	23,5%
CBFbeta/MYH11 inv(16)/t(16;16)	6,2%
MLL 11p23	3,4%

Auf der molekularen Ebene entsteht t(8;21) und inv(16) durch die Fusion von RUNX1/CBFA2T1 und CBFb/MYH11, bzw. durch die Unterbrechung der Wirkung des CBF-Komplexes, der die Hämatopoese reguliert. Der CBF-Komplex besteht aus einem Heterodimer RUNX1 (früher AML1) und dem CBFb-Protein und Aktivatoren der normalen myeloischen Zellentwicklung. (45)

In einem AML-Kartierungsverfahren (SAM) identifizierten Bullinger et al. bei mehr als 1000 Genen, eine Korrelation mit den CBF-Gruppen t(8;21) und inv(16). So zeigt sich bei t(8;21) vermehrt POU4F1, CAV1, HSPG2 und TRH. Inv(16) verweist auf eine hohe Expression von NT5E, PTPRM, CLIPR-59 und SPARC. In einer Gruppe (I) mit einer hohen Expression von BRCA1, RAD51, CHEK2 können 19% der AML Typ 2 und 69% der AML Typ 4 laut FAB-Klassifikation zugeordnet werden. In einer anderen Gruppe (II) wird eine Anhäufung von mTOR, (EIF4EBP1, PDPK1), RICTOR, AKT1 (FOXO1A, BIRC3, BIRC6, PTEN) zusammengefasst; hier ist zu 36% eine Übereinstimmung mit der AML Typ 2 zu sehen und zu 47% mit der AML Typ 4. Beide Untersuchungsergebnisse sind jedoch nicht signifikant.

Die Mutation von FLT3 spielt eine zentrale Rolle der AML und tritt mit einer Längsmutation (FLT3-LM) zusammen mit NPM1 zu 20-27% auf. (48) Während die FLT3- Längsmutation eine schlechte Prognose zeigt, ist der Hinweis auf NPM1-Mutation mit einem besseren Verlauf assoziiert. Ferner sind kleine Mutationen in der Tyrosinkinase (TKD) von FLT3 (FLT3-TDK) in 5-8% aller AML-Formen gefunden worden. Die hieraus resultierende Prognose ist jedoch noch nicht geklärt. (49) Es ist jedoch bekannt, dass FLT3 –Mutationen

bei CD 34 positiven Stammzellen zur optimalen Differenzierung der Monozyten erforderlich sind.(54) Mutationen des NRAS Proto-Onkogen sind in 10-15% der AML nachgewiesen.(48)

Tabelle 9: Mutationen der CMML und AML (48)

Mutation	CMML (%)	de novo AML (%)	s-AML (%)	t-AML (%)	AML-Rezidiv (%)
FLT3-LM	0	22,4	11,6	12,0	27,7
FLT3-TKD	0	5,5	1,9	1,8	2,4
MLL-PTD	3,3	6,0	7,7	3,3	8,3
NRAS	10,0	9,8	12,0	12,1	9,0
KITD816	0	1,8	1,5	1,2	1,4

Mutationen von FLT3 werden seit 1997 beschrieben (50) und stellen die häufigste Mutation der AML dar. Wie die FLT3-Längsmutation ist die FLT3-TKD stärker mit der de novo AML assoziiert als mit der s-AML oder t-AML. (49)

Bei adulten AML-Patienten tritt die FLT3-Längsmutation (früher FLT3-IDT) zu 20%-27% auf, bei juvenilen Patienten 10%-16%, und ist mit einem Progress der MDS in eine s-AML zu setzen. Die Mutation des Gens FLT3 findet auf dem Genort 13q12 statt, der für die Kodierung der juxtamembranen Membran des FLT3 zuständig ist. Bacher et al. (49) weisen bei 4,8% aller AML-Patienten eine FLT3-TKD-Mutation nach. Eine geschlechtsspezifische Zuordnung gibt es nicht. Das Durchschnittsalter liegt bei 59,5 Jahren und ist nicht signifikant unterschiedlich zu der nicht FLT3-TKD-veränderten Gruppe. Die Leukozytenzahl ist signifikant erhöht in der FLT3-TKD- mutierten Gruppe ($p=0,001$), und erniedrigt zur FLT3-Wildtyp-Gruppe ($p=0,04$). Die Verteilung der FLT3-TKD-Mutation der AML- de novo ist fast doppelt so hoch, verglichen mit der Verteilung der s-AML und t-AML (= 5,3%: 2,4%:2,0%). Die FLT3-TKD- Mutation tritt signifikant häufiger bei der de novo AML auf als bei der s-AML oder nach vorrausgegangener Chemotherapie ($p=0,01$). (49)

Tabelle 10: Punktmutationen der Tyrosinkinase bei der FAB-klassifizierten AML (49)

Mutation	Normaler Karyotyp	AML-Typ M4	AML-TYP M 4eo	AML-Typ M5a	AML-Typ M5b
FLT3-TKD	6%	8,1%	4,2%	5,6%	13,2%

Tabelle 11: Punktmutationen innerhalb der Tyrosinkinase (49)

Genloci	NPM1	CEBPA	NRAS	KITD816
FLT3-TKD	8,8%	7,9%	7,7%	
FLT3-TKD und FLT3-LM				2,3%

Einige der Mutationen zeigen eine günstige Prognose, wie z.B. NPM1 (51) und CEBPA (52).

Andere Mutationen weisen auf eine schlechte Prognose hin, wie z.B. MLL-PTD (53). In 35% der AML-Fälle ist eine Veränderung des Nucleophosmin-Gens (NPM1) nachzuweisen. Eine Mutation von NPM1 ist mit einer Remissionsinduktion verbunden, dessen Langzeitverlauf noch zu beobachten ist. (56)

Eine erhöhte Expression des Transkriptions-Faktors EVI1 (Vorkommen in 8% der Fälle) ist ein schlechter Prognosefaktor. (55) Andere Beispiele der genetischen Aberration der AML sind Mutationen des Tyrosin-Kinase-Rezeptors C-KIT, und der GTPases, N-RAS, und K-RAS. Doch diese Mutationen zeigen keine Korrelation zur AML- Prognose oder Verlauf. (55, 56)

Tabelle 12: Verteilung der N-RAS-Mutation der AML-Typen (56)

Mutation	de novo AML	s-AML	t-AML
N-RAS	10%	12,1%	10,9%

C-Kit ist eine von insgesamt 58 bekannten transmembranen Rezeptor-Tyrosinkinase, zu der auch der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), CSF-1 (colony stimulating factor-1) und c-fms (macrophage colony stimulating factor = (M-CSF)) Rezeptor zählt. Der c-Kit-Rezeptor, der auf dem Chromosom 4 lokalisiert ist, ist an der Vermehrung, Differenzierung, funktioneller Reifung, sowie am Erhalt einer Vielzahl an differenzierter Zellen beteiligt. Seine Mutationen können zu myeloischen Leukämien führen.

Bei der CMML ist eine seltene chromosomale Veränderung $t(5;12)(q33;p13)$, welche das ETV6/TEL-Gen (12p13) aktiviert, um den PDGF-BR, der auf 5(q;33) platziert ist, zu starten. (44)

Ein geringer Anteil von Patienten zeigt eine chromosomale Translokation, die die Verschlüsselung Tyrosin-Kinase übernimmt. Hierbei fällt ein gleichzeitiges Auftreten von platelet-derived-growth-factor-receptor B (PDGFRB) auf dem Chromosom 5 (q33) oder fibroblast-growth-factor-receptor-1 (FGFR1) auf dem Chromosom 8 (p11) auf. (44)

Eine Veränderung des PDGFRB-Gens ist definiert als Subgruppe der MPD, die durch eine Eosinophilie, Monozytose gekennzeichnet ist und in seltenen Fällen einen Übergang in die AML zeigt. (57)

Eine diagnostische Abgrenzung der CMML von der AMML auf dem Boden der Zytomorphologie ist oft schwer. Die Hinzunahme von Zytogenetik und Molekularzytogenetik führt selten differentialdiagnostisch weiter.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der in der Universitätsklinik Düsseldorf diagnostizierter Patienten, mit CMML und AML Typ 4 und Typ 5 durch laborexperimentelle Untersuchungen die Differenzierung der monozytären Zellen zu charakterisieren. Im Einzelnen soll

1. ein immunphänotypisches Profil für AML M4/M5 und CMML erstellt werden
2. eine Überprüfung der Prognoseparameter einschließlich Übergang von CMML nach AML erfolgen.

3. Methoden

3.1 Immunzytologische Untersuchung

Die immunologische Untersuchung mittels Durchflußzytometrie zur Differentialdiagnose hämatologischer Erkrankungen hat sich in der Routine durchgesetzt. Die Vorteile der Immunphänotypisierung mittels Durchflußzytometrie liegen in der schnellen Analytik, ihrer hohen Sensitivität und der Multiparameteranalyse, verbunden mit der exakten Quantifizierung der malignen Zellpopulationen.

Da jede Zelle der Hämatopoese einem genetisch codierten Reifungsprozess aus einer Stammzelle unterliegt, besitzt sie eine unterschiedliche Proteinstruktur (= Antigene), die auf der Zellmembran exprimiert ist. Das Expressionsmuster dieser Antigenstrukturen verändert sich im Laufe der Zellreifung, so dass der Nachweis von CD- Markern = Cluster of Differentiation signifikant ist. (3.9 Tab. 1; 3.10 Tab. 2)

Die immunzytologische Untersuchung erfolgte hier nach Separation (Dichtegradientenzentrifugation nach Böyum et al. 1974) und Kryokonservierung von peripherem Blut oder Knochenmark in flüssigem Stickstoff bei -196°C .

5 – 10 ml heparinisiertes Knochenmark wurde 1:4 mit PBS – Pufferlösung verdünnt und über einen Dichtegradienten (Ficoll, Dichte $1,077\text{g/cm}^3$, Seromed, Berlin) geschichtet. Nach Zentrifugation (840Ud/min über 20 min bei 20°C) wurde die mononukleäre Zellfraktion (Lymphozyten, Monozyten, kernhaltige rote Vorstufen, Blasten und mononukleäre weiße Vorstufen) abgesaugt und nach Resuspension in PBS gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Mehrzahl der verwendeten monoklonalen Antikörper war mit Fluoreszenzfarbstoffen (FITC, PE) direkt konjugiert. Folgende, überwiegend über die „Cluster of Differentiation“ = CD (Fifth International Conference On Human Leukozyte Differentiation Antigens, 1993) definierte membranständigen Antigene

wurden durch entsprechende Antikörper markiert: CD 33, CD 14, CD 61, Glycophorin A, CD 34, CD 117. Als Doppelmarkierungen wurden CD 14/CD 34, CD 38, CD 117, HLA-DR, CD 11b, CD 13, CD 33, CD 56, CD 15, CD 54, CD 58, CD 4 durchgeführt.

Aufgetaute und gewaschene Zellen wurden zunächst zur Elimination unspezifischer Fluoreszenz mit 100µl Normalserum der Spezies (überwiegend Maus), die den Antikörper produzierenden, versetzt (30 min, 4° C). Nach zwei Waschvorgängen mit PBS (Zentrifugation 220 Ud/min 10 min, 4° C) wurden die Zellen mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörpern (5–10 µl je nach Antikörper versetzt, im Dunklen inkubiert 30 min, 4° C). Nach zwei Waschvorgängen mit PBS/ Natriumacid 0,1% (Zentrifugation 220 Ud /min, 10 min, 4° C), fand eine Fixierung der markierten Zellen mit jeweils 500 µl Formaldehyd 0,5% statt.

Diese DNA-Isolierung und die Fluoreszenzmarkierung wurden nach einem modifizierten Verfahren nach Vindelöv et al. 1983 durchgeführt und nach maximal 24 Stunden im FACScan-Durchflußzytometer analysiert. Bei Markierungen mit unkonjugierten Antikörpern (indirekte Fluoreszenzmarkierung) wurden die Zellproben nach Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper und anschließenden Waschvorgängen mit einem fluoreszenzmarkierten, isotypspezifischen Sekundärantikörper (20 µl / Probe) versetzt.

Das weitere Verfahren entsprach dann der direkten Immunfluoreszenzmarkierung. Als Negativkontrolle zur jeweiligen Antikörpermarkierung wurden isotypidentische unspezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt. (Isotypkontrolle).

Die Immunphänotypisierung wurde an einem FACScan Durchflußzytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, USA) nach dem von Raffael (11) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Bei den Analysen wurden die jeweiligen Zellpopulationen zunächst nach morphologischen Parametern mittels Vor- und Seitwärtsstreulicht eingegrenzt. Anschließend wurde die jeweilige Markerexpression der Population im entsprechenden Gate rechnergestützt gemessen

und ausgewertet. (FACScan Research Software Version A 12/86 HP Betriebssystem Pascal 3.1, Becton Dickinson, Mountain View, USA). Eine positive Markerexpression wurde angenommen, wenn ein Antigen bei > 20% aller untersuchten Zellsorten nachweisbar war.

3.2 Untersuchungsmaterial

Das zu untersuchende Knochenmark wurde kryokonserviert aus dem MDS-Register der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Der Biopsiezeitpunkt des Knochenmarkes war bei Erstdiagnostik gewählt worden, also vor etwaigen Therapieansätzen.

Zur Auswertung standen 30 CMML- und 33 AML- Knochenmarkproben zur Verfügung, die in dem Zeitraum 1990-1999 asserviert wurden.

3.3 Thymidinkinasebestimmung im Serum

Mittels Radioenzymassays wurde bei einem Teil der Patienten die Thymidinkinase im Serum bestimmt (Prolifgen TK-REA, Byk-Sagtec, Dietzenbach). Die Enzymaktivität wird direkt gemessen, dies gelingt über eine Radioaktivmarkierung mit IUdR 125 und Absorption des Phosphorylierungsproduktes an einen festen Träger. Die Thymidinkinaseaktivität ist proportional zur gebundenen Radioaktivität. Das Essay wurde für den Nachweis des Isoenzym TK1 optimiert, da dieses Isoenzym vorwiegend in Zellen der G1 bis S-Phase des Zellzyklus enthalten ist.

Die bei -20° C kryokonservierten Serumproben wurden nach den Herstellerempfehlungen bearbeitet, mittels Gammazintillationszähler gemessen und anhand einer erstellten Eichkurve ausgewertet.

So ergab sich eine Normalverteilung bei gesunden Patienten, die keinen Anhalt für eine Veränderung der peripheren Blutzellen zeigten, mit einer mittleren Thymidinkinasekonzentration von 2,9± 2U/µl. Als Normbereich wurde eine Konzentration von < 5U/µl festgelegt. (1 U/µl Thymidinkinase entspricht $1,2 \times 10^{18}$ Katal)

Vergleichbare Ergebnisse zeigt Gronowitz bei einer Untersuchung von 99 Blutspendern und 25 Schwangeren. (14)

3.4 Lysozymkonzentration im Serum

Die von Prockop und Davidson beschriebene turbidimetrische Konzentrationsbestimmung wurde bei 546nm durchgeführt, um die Serumkonzentration des Lysozym zu bestimmen (15).

Die Reagenzien wurden von der Firma Behring, Mannheim, Testomar-Lysozym, bezogen, dessen Prinzip es ist, eine Trübungsabnahme nachzuweisen, da die Transluminanz der Suspension durch Lysozym gelöste Mikrokokkenzellwände zunimmt.

Bei normaler Nierenfunktion liegt der Normwert für Serum-Lysozym bei 10-17mg/l.

3.5 Zytochemische Färbung

Die Färbung der Knochenmark- und Blutausstriche wurde standardisiert in dem hämatologischen Labor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt nach Begemann, 1994, Shibata 1985 (16).

Die Knochenmarkausstriche wurden zur Zelldifferenzierung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) angefärbt und 500 kernhaltige Zellen wurden ausgezählt.

Bei der Differenzierung der peripheren Zellen wurden 200 Leukozyten ausgewertet. Ebenso wurde bei der Differenzierung auf Anisozytose, Poikilozytose, Makrozytose, Ovalozytose, Dimorphismus der Erythrozyten, basophile Tüpfelung, Polychromasie, kernhaltige rote Vorstufen, Pseudo-Pelger-Zellen, Hypersegmentierung, Monozytenzahl, Thrombozyten-anisometrie, Riesenplättchen, Hypogranulation und Megakaryozytenfragmente geachtet.

(4.1.1 Tab. 1)

3.6 Klinische Routineuntersuchung

Bei der klinischen Untersuchung wurde bei allen Patienten eine Anamnese erhoben, bei der auch nach rezidivierenden Infekten, Fieberschüben, Anämiesymptomen, und Blutungszeichen gefragt wurde. Ebenso wurden toxische Parameter, wie Medikamente, exogene Noxen, Chemo- oder Strahlentherapie abgeklärt. Eine Familienanamnese wurde erhoben, um die genetische Disposition hämato-onkologischer Erkrankungen abzuklären.

Bei der klinischen Untersuchung wurden Lymphknotenveränderungen, Leber- und Milzschwellung, Hautinfiltrationen, extramedulläre Infiltrationen, Schleimhauthyperplasien, und periphere Blutungszeichen dokumentiert.

3.7 Serologische Routineuntersuchung

Im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Düsseldorf, Prof. Dr. Reinauer wurden die Laborparameter standardisiert analysiert. Hierzu zählten: Blutbild, Retikulozyten, Eisen, Ferritin, Transferrin, Haptoglobin, Bilirubin, Leberenzyme, Laktatdehydrogenase, Gesamteiweiß, Elektrophorese, Immunglobuline und γ -Globulin.

3.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte rechnergestützt mit Hilfe des Programmsystems SPSS (12). Zur Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde das Verfahren nach Kaplan (13) verwendet. Gewertet wurde ausschließlich der Todeszeitpunkt. Patienten, die bis Ende des Beobachtungszeitraumes (31.12.2004) noch lebten oder bereits zuvor als „lost to follow up“ ausgeschlossen waren, wurden zensiert.

In den folgenden Tabellen sind die Antigenexpressionen der verschiedenen Zellen des Blutes und Knochenmarks (3.9 Tab. 1; 3.10 Tab. 2) dargestellt.

3.9. Antigenmarker verschiedener Zellreihen, Tabelle 1:

CD – Expression der monozytären und granulopoetischen Zellpopulation

Hämatopoetischen Zelle	Antigenexpression
Unreifer Monoblast CFU-M	CD 13, CD 33, CD 65s, CD 117
Monoblast	CD 13, CD 15, CD 33, CD 65s
Unreifer Monozyt	CD 13, CD 33, CD 64, CD 65s
Monozyt	CD 13, CD 15, CD 64, CD 65s
Unreifer Myeloblast CFU-G	CD 13, CD 33, CD 65s, CD 117, cyMPO
Myeloblast	CD 13, CD 33, CD w65, CD 117, cyMPO
Myelozyt	CD 13, CD 33, CD 15, CD 65s, cyMPO
Metamyelozyt	CD 13, CD 33, CD 15, CD 65s, cyMPO
Granulozyt	CD 13, CD 33, CD 15, CD 65s, cyMPO

3.10 Tabelle 2:
zelluläre Expression und Funktion von zellulären Oberflächenantigenen

Zelluläre Expression	CD-Marker	Andere Bezeichnung	Funktion
T – Helferzellen, Subpopulation der Monozyten, Subpopulation der kortikalen Thymozyten	CD 4	T4-Antigen	Antigenpräsentation, Korezeptor für MHC – Klasse II – Moleküle, Rezeptor für HIV, assoziiert mit P56 – Ick Gehört zur IG – Superfamilie
T-Zellen,Thymozyten, natürliche Killerzellen, unreife myeloische Zellen	CD 7	T2-Antigen	Frühester T-Zell-Marker, unbekannte Funktion
Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, natürl.Killerzellen	CD 11b	Alpha- Kette von Makrophagen-1	Zell-Zell-Adhäsion, Extravasation, Chemotaxis, Phagozytose, Ligand von CD 54, Rezeptor für C3bi, Fibrinogen und Faktor X Verbindet sich mit CD 18 und bildet LFA-1-Integrin
Granulozyten, Monozyten, diverse Zelltypen	CD 13	Aminopeptidase N	Abbau biologisch aktiver Peptide, Rezeptor einiger Coronarviren
Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen, follikulär dendritische Zellen, Langerhans, Kupffer, Monozytenleukämie	CD 14	LPS – LBP - Rezeptor	Rezeptor für Lipopoly-saccharid und lipopoly-saccharidbindenden Komplex Guter Monozyten – Makrophagen – Marker
Granulozyten, Monozyten, Sternberg-Reed, Hodgkin, Diverse Tumorzellen	CD 15	Lewis x, Le x, Hapten x, 3 – FAL, Lakto-N-FucopenttatoseIII, SSEA - 1	Zelladhäsion, Ligand von CD 62E und CD 62P, Chemotaxis und Phagozytose neutrophiler Granulozyten
Pan-B, außer Plasmazellen	CD 19	B4-Antigen	B-Zellproliferation, bildet Signaltransduktionskomplex mit CD 21, CD 81 und Leu 13
Granulozyten, Monozyten und deren Vorläuferzellen	CD 33		Unbekannt
Myeloische und lymphatische Vorläuferzellen	CD 34		105-120 kD Glycoprotein

Zelluläre Expression	CD – Marker	Andere Bezeichnung	Funktion
Plasmazellen, Thymozyten, B-Zellen, aktive Keimzentrumzellen, aktive T-Zellen, Monozyten, Vorläuferzellen	CD 38	T 10 Antigen	Leukozyten- Aktivierungs- antigen, cADP-Ribosyl-Cyclase- Aktivität
Aktive Endothelzellen, aktive T-Zellen aktive B-Zellen Monozyten Epithelzellen	CD 54	ICAM-1	Adhäsion: Ligand von LFA-1 und Makrophagen 1, Rhinovirus – Rezeptor, Endothelrezeptor von Plasmodium falciparum infizierter Erythrozyten
Natürliche Killerzellen, neuroektodermale Zellen, T- Zellen vom Subtyp	CD 56	N-CAM, NKH-1- Antigen	Homotypische Zelladhäsion, gehört zur Ig-Superfamilie
Leukozyten, Epithelzellen	CD 58		Adhäsion (LFA-3) Ligand für CD 2
Thrombozyten, Megakaryozyten	CD 61	CD Mega	Glycoprotein IIIa, Vitronec- tin-Rezeptor-β-Kette
Monozyten, Makrozyten, aktive neutrophile Granulozyten	CD 64	FC γ-RL	Hochaffiner FY-Rezeptor für monomeres IgG1 und IgG3, Phagozytose, ADCC, Cytokin- und Superoxid- Freisetzung
Granulozyten, Monozyten	CD w65	VIM-2, polares Glyko- sphingolipid, (Oligosacchard- Epitop)	
Vorläuferzellen	CD 117	c-kit- Genprodukt: SCFR, p145 (c-kit)	Rezeptor für SCF, gehört zur Rezeptor-Tyrosinkinase Klasse III- Familie
B-Zellen, follikulär dendritische Zellen	HLA-DR als nicht CD – Antigen	MHL oder HLA Klasse II- Antigene	
Erythrozyten	CD Glyco- phorin	CD Ery	

4. Ergebnisse

4.1 klinische Parameter

4.1.1 Tabelle 1:

Parameter der Patienten	CMML	AML	P
Patientenanzahl	30	33	
Altersdurchschnitt	66 Jahre	51 Jahre	0.0005
Geschlecht m:w	4:1	1:1	0.011
Blutungszeichen	39.7%	60.3%	0.087
Dysplasien in Blut und Knochenmark	100%	41%	0.0005
Infekte bei Erstdiagnose	28%	32%	0.76
Splenomeglie	20%	44%	0.053
Hepatomegalie	40%	32%	0.054
Lymphome	16.7	45.7	0.021
Hämoglobin	11.72 g%	8.88 g%	0.0005
Thrombozyten	98.37*10 ⁹ /l	61.17*10 ⁹ /l	0.069
Leukozyten	17143.1*10 ⁹ /l	80065.7*10 ⁹ /l	0.0005
Granulozyten	7601.26*10 ⁹ /l	7274.18*10 ⁹ /l	0.828
LDH	242U/l	946U/l	0.0005
Thymidinkinase	120U/μl	285U/μl	0.002
Verstorben	59%	74%	0.28

Zunächst wurden klinische und hämatologische Parameter der CMML- und AML-Patienten verglichen. Auffallend ist der Unterschied im Personenkreis, der aus dieser Statistik hervorgeht: 80% Männer mit einem Durchschnittsalter von 66 Jahren bei der CMML, im Vergleich zur AML, bei der die Geschlechterverteilung gleich ist und das mittlere Alter bei 51 Jahren liegt.

Der Hb-Wert der CMML-Patienten liegt im Durchschnitt unter dem Normwert mit 11,7g%, während bei der AML der Hämoglobinwert mit Werten von 8,8 g% erniedrigt ist. Der mediane Leukozytenwert liegt bei der AML signifikant höher.

Enzymatisch weisen beide Leukämieformen Signifikanzen auf: Die CMML zeigt nur eine leichte LDH-Erhöhung, während die AML fast den 4-fachen Normwert anzeigt.

Die Thymidinkinase ist bei der AML um mehr als das Doppelte gegenüber der CMML auf 285 U/µl erhöht.

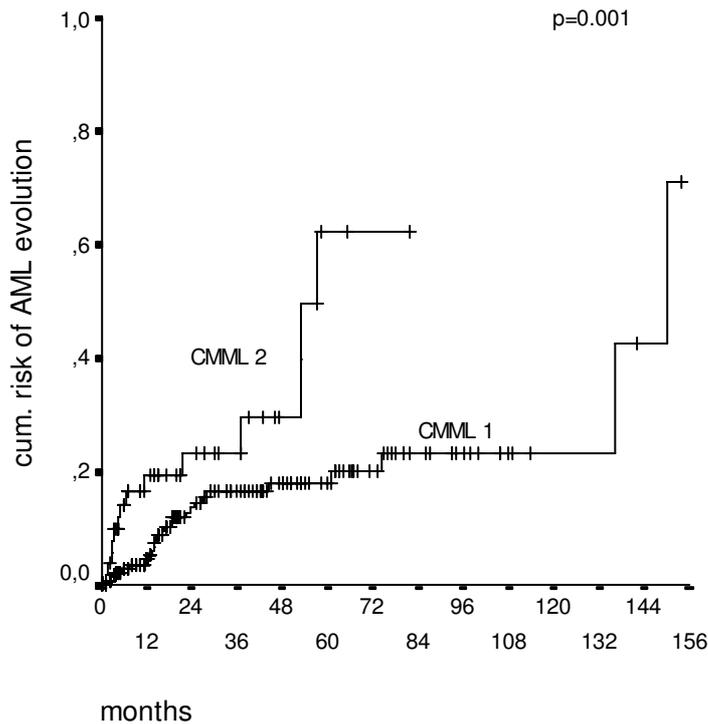
Klinisch auffällige Untersuchungsergebnisse spiegeln sich in der Splenomegalie, die bei der AML doppelt so häufig auftritt wie bei der CMML. Klinisch manifeste Lymphome treten bei der AML dreimal so häufig auf wie bei der CMML. AML-Patienten leiden wesentlich eher an Blutungen (60%), während CMML-Patienten zu 40 % Blutungen aufweisen.

Unspezifische klinische Untersuchungsergebnisse sind hierbei Infektionen und Hepatosplenomegalie.

Im Untersuchungszeitraum sind 74% der AML-Patienten und bei den CMML-Patienten 59% verstorben, dieser Unterschied ist nicht signifikant.

4.2 Prognoseparameter bei CMML

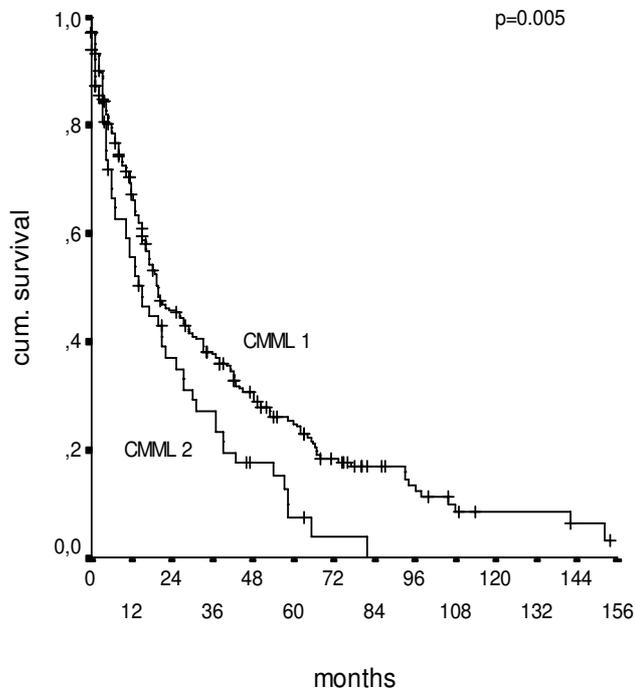
Abb.4.2.1: Kaplan Meier Plots des kumulativen Risikos der AML Entwicklung bei Patienten mit CMML



Diese Abbildung stellt mit Hilfe des Kaplan Meier Plots das kumulative Risiko der AML-Entwicklung bei Patienten mit CMML dar, die nach dem WHO-Score unterschieden werden. Patienten mit CMML 2 (n=71, medullärer Blastenanteil >10% und <20%) haben ein sehr viel höheres Risiko einer AML Entwicklung (p=0.001). Leukämieübergänge finden zu jedem Zeitpunkt der Nachbeobachtung statt. Nach 2 Jahren sind in der CMML 1-Gruppe ca.12% in eine AML übergegangen, bei der CMML 2 ca. 24%. Nach 5 Jahren sind in der CMML 1 Gruppe 18% in eine AML übergegangen, bei der CMML 2 ca. 50%.

Diese Werte sind der CMML-Datei entnommen und stammen von nicht therapierten Patienten, von denen 30 typisiert worden sind.

Abb.4.2.2: Kaplan Meier Plots des kumulativen Überlebens von CMML –Patienten



Diese Abbildung zeigt das kumulative Überleben von CMML-Patienten, die anhand des WHO-Scores gruppiert wurden. Das mediane Überleben von Patienten mit CMML 1 liegt mit 20 Monaten signifikant höher als das von Patienten mit CMML 2 (15 Monate ($p=0.003$)). Nach 20 Monaten lebten noch 50% der CMML 1 –Patienten, während nach 15 Monaten 50% der CMML 2-Patienten verstorben waren. Diese Werte sind der CMML-Datei entnommen und stammen von nicht therapierten Patienten, von denen 30 typisiert worden sind.

4.2.3 Tab.2: CMML: Krankheitsverlauf (Überlebenszeit und AML-Übergang) anhand des Düsseldorfer MDS-Registers

CMML Formen	%	mediane Überlebenszeit (Monate)	p	kum. AML-Übergang 2 Jahre (%)	kum. AML-Übergang 5 Jahre (%)	P
CMML 1 (WHO)	72	20	0,003	12	18	0,001
CMML 2 (WHO)	28	15		24	50	
WBC $\geq 13000/\mu\text{l}$ (MPD)	50	24	0,03	14	24	n.s.
WBC $\leq 13000/\mu\text{l}$ (MDS)	50	15		15	28	n.s.

Patienten mit einem niedrigen medullären Blastenanteil ($< 10\%$) = CMML 1), haben nach Diagnosestellung eine höhere Lebenserwartung; jedoch ist der Übergang in eine AML bei 12% der Patienten nach 2 Jahren erfolgt. Bei der selteneren Form der CMML mit medullären Blastenanteil $> 10\%$ und $< 20\%$ = CMML 2 sind 50% der Betroffenen nach Diagnosestellung nach 15 Monaten verstorben. Das Risiko eines Übergangs in die AML ist doppelt so hoch wie bei der CMML 1.

Die CMML-Differenzierung proliferative vs. dysplastische Form, zeigt ähnliche Ergebnisse: Bei der MPD-Form besteht eine längere mittlere Überlebenszeit, mit einem signifikanten Unterschied zur CMML-MDS. Auch der Übergang in die AML zeigt einen früheren Verlauf, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

4.2.4

Tab. 3: Parameter für CMML-Patienten in den unterschiedlichen Scoring-Systemen

Parameter/Score	Bournemouth	MDAPS	Spanien CMML	Düsseldorf
	x	x	x	x
Unreife myeloische Vorstufen		x		
Hämoglobin=Hb	x	x		x
Thrombozyten =PLT	x		x	
Absolute Neutro- philenzahl=ANC	x			
Leukozyten=WBC			x	
Medulläre Blastenzahl =MBL			x	x
Lymphozyten		x		

Die Kombination von unterschiedlichen Parametern zur Prognose der Erkrankung ist erforderlich und hilfreich zur Risikoeinschätzung und zur Gruppierung. Von den vier Scores werden die medullären Blasten als wichtiges Kriterium angesehen, während die unreifen myeloischen Vorstufen nur von dem MDAPS (22) = M.D.Anderson Prognostic Score als wichtig erachtet werden. Für die Einteilung ist der Hb-Wert wichtig, der von Bournemouth (21), M.D.Anderson Prognostic Score und Düsseldorf (24) genutzt wird. Bournemouth Score und der spanische Score (23) nutzen beide die Thrombozytenanzahl. Während die absolute Neutrophilenanzahl für Bournemouth die Score-Einteilung beeinflusst, zieht der spanische Score die Leukozytenanzahl zu Hilfe. Enzymatischer Scoreparameter ist die LDH, deren Werte in den spanischen und Düsseldorfer-Score eingehen. In den M.D.Anderson Prognostic Score fließt als ein weiterer Parameter die Lymphozytenzahl im peripheren Blut ein.

4.2.5

Tab.4: Genaue Definitionen der 4 CMML Prognose-Scores

Parameter/Score	Bournemouth Score	Düsseldorf Score	MDAPS	Spanischer Score	CMML	Punkt-wert
Hb (g/dl)	10	<9	<12			1
LDH (NW = Normalwert 240U/l)		Erhöht		> 1,5 x NW		1
Thrombozyten/ μ l	<100000			<100000		1
Abs. Neutrophilenzahl im peripheren Blut/ μ l	<2500, >16000					1
Medulläre Blasten = MBL (%)	>5	>5	10	5		1
Absolute Lymphozytenzahl im peripheren Blut / μ l			<2500			1
Leukozytenzahl im peripheren Blut/ μ l				>10000		1
Unreife myeloische Vorstufen (%)			>0			1
Gruppierung nach Punktwert/Score	Bournemouth Score	Düsseldorf Score	MDAPS	Spanischer Score	CMML	
Geringes Risiko	0-1	0	0-1	0-1		
Mittleres Risiko I		1-2	2			
Mittleres Risiko II			3			
Hohes Risiko	2-4	3-4	4	2-3		

Die CMML-Parameter werden je nach Erfüllung der Forderung der einzelnen Score in Punktwerte umgesetzt. Diese Punkte werden addiert und aus der Summe ergibt sich die Risikoeinschätzung von geringem bis hohem Risiko.

4.2.6

Tabelle 5: Überlebenszeit und AML-Übergang der CMML-Patienten in Übereinstimmung der unterschiedlichen Scores, anhand des MDS-Register Düsseldorf (288 CMML-Patienten)

Score	CMML Patienten (%)	Mediane Überlebenszeit (Monate)	P	Kumulativer AML-Übergang nach 2 Jahren (%)	Kumulativer AML-Übergang nach 5 Jahren (%)	p
Bournemouth modifiziert, geringes Risiko	30	27	0,02	12	16	n.s
Bournemouth modifiziert, hohes Risiko	70	15		17	38	
MDAPS, geringes Risiko	39	36	0,00005	11	22	n.s
MDAPS, mittleres Risiko I	37	16		22	44	
MDAPS, mittleres Risiko II	18	13		26	26	
MDAPS, hohes Risiko	6	9		20	20	
Düsseldorf, geringes Risiko	6	93	<0,00005	8	8	n.s
Düsseldorf, mittleres Risiko	60	26		15	23	
Düsseldorf, hohes Risiko	34	11		15	23	
Spanien, geringes Risiko	45	30	0,0009	17	26	n.s
Spanien, hohes Risiko	55	14		17	30	

Die Zahl der Niedrigrisikopatienten, die der Bournemouth Score erkennt, liegt bei 30% recht hoch, entsprechend niedrig ist die mediane Überlebenszeit mit 27 Monaten. Ein Übergang in eine AML ist in dieser Gruppe nach 2 Jahren zu 12% und nach 5 Jahren zu 16 % erfolgt. Im Einzelnen zeigt die Risikoeinteilung nach Bournemouth in der medianen Überlebenszeit eine Differenz von 12 Monaten, die die Unterscheidungskriterien (MBL, Hb, PLT, ANC) geringes vs. hohes Risiko signifikant werden lassen.

Der M.D.Anderson Prognostic Score empfiehlt als Kriterien MBL, IMP, Hb und Lymphozyten. Die Niedrigrisiko-Patientgruppe umfasst 39% der Patienten, bei der eine mediane Überlebenszeit von 36 Monaten besteht. Bei der mittleren Risikogruppe mit zwei Score-Punkten sind 37% der CMML-Patienten erfasst, die eine mediane Überlebenszeit von 16 Monaten haben. Die mittlere Risikogruppe wird noch einmal erweitert mit insgesamt 3 Score-Punkten. Hier sind 18% der Patienten vertreten mit einer medianen Überlebenszeit von 13 Monaten. In der Hochrisikogruppe befinden sich 6% der CMML-Patienten, diese haben eine mediane Überlebenszeit von 6 Monaten. Das Risiko in einen AML-Übergang ist bei allen vier Gruppen nicht signifikant: Nach 2 Jahren ist der Übergang in der Niedrigrisikogruppe zu 11%, nach 5 Jahren zu 22% erfolgt. In der mittleren Risikostufe erfolgt die Weiterentwicklung in die AML zu 22% nach 2 Jahren, nach 5 Jahren zu 44%. Die mittlere Risikogruppe mit 3 Score-Punkten erfährt eine AML-Umwandlung zu 26% nach 2 Jahren und nach 5 Jahren. Die Hochrisikogruppe zeigt nach 2 und 5 Jahren zu 20% einen Übergang in eine AML.

Im spanischen Score haben Niedrigrisikopatienten eine mediane Überlebenszeit von 30 Monaten, während die 55% der Hochrisikogruppe 14 Monate mediane Überlebenszeit aufweisen. Im spanischen Score werden geringes vs. hohes Risiko durch die Parameter MBL, PLT, WBC, LDH signifikant erfasst.

Im Düsseldorfer-Score werden nur 6% der Patienten in die Niedrigrisikogruppe, 60% in die mittlere Risikogruppe und 34% in die Hochrisikogruppe gruppiert. Hierdurch gelingt es,

Patienten mit guter Prognose zu identifizieren: der Niedrigrisikopatient zeigt eine mediane Überlebenszeit von 93 Monaten, der Mittelrisikopatient von 26 Monaten, und der Hochrisikopatient hat eine mittlere Überlebenszeit von nur 11 Monaten. Das Risiko des AML-Übergangs ist in der ersten Gruppe nach 2 und auch nach 5 Jahren bei 8% der Patienten identisch, der Übergang bei Mittel- und Hochrisikopatienten nach 2 Jahren zu 15% und nach 5 Jahren zu 23% zu beobachten.

Die Düsseldorfer Einteilung bezieht sich auf MBL, Hb, LDH und erzielt eine Signifikanz $< 0,00005$ in den drei Untergruppen.

4.3: Immunphänotypisierung bei CMML und AML

4.3.1:

Immunphänotypisierung der CMML

In der Versuchsreihe der CMML standen 30 kryokonservierte Knochenmarkproben des MDS-Registers der Universität Düsseldorf zur Verfügung, hieraus wurden folgende Parameter per Durchflußzytometrie bestimmt:

CD 14/11b, CD 14/13, CD 14/15, CD 14/33, CD 14/54, CD 14/58, CD 34/117, CD 34pos, CD Mono, CD Glyc, CD Myelo, CD 61, CD 14/34, CD 14/117, HLA-DR, CD 14/56, CD 14/4, CD 14/38.

CD 14/11b kommt auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten vor und ist in allen Proben nachzuweisen. CD 14/13, Marker für Monozyten und Granulozyten, liegt bei 25 von 27 Proben vor. CD 14/15, ebenfalls für diese Zellpopulationen typisch, zusätzlich jedoch noch für diverse Tumorzellen, ist nur bei 17 von 27 Patienten ausgeprägt. CD 14/33, bei Granulozyten, Monozyten und deren Vorläuferzellen, ist bei 22 von 26 Patienten zu erkennen. CD 14/54 nur auf Monozyten vorzufinden, ist bei 10 von 27 Patienten nachzuweisen. CD 14/58, exprimiert auf Leukozyten und Epithelzellen, ist bei 19 von 27 Proben positiv. CD 34/117, auf myeloischen Progenitorzelloberflächen vorherrschend, ist bei 6 von 22 Patienten ausgeprägt.

Werden aber mit CD 34 pos. hämatopoetische Vorläuferzellen und Endothelzellen erfasst, sind 18 von 27 Proben positiv. Ein Ausdruck für die monozytäre Oberfläche ist CD 11b und CD 14/33, diese sind bei 25 von 30 Patienten nachzuweisen. CD Glycophorin A, auf der Erythrozytenoberfläche, ist bei 27 von 27 Probanden nachzuweisen. CD Mono, ein Zusammenschluss von CD 11b, CD 14/33 und CD 33, auf Granulozyten, Monozyten, und deren Vorläuferzellen darzustellen, ist bei 18 von 30 Probanden positiv. Bei 27 von 30 Patienten ist CD 61 positiv exprimiert. Bei keinem der 26 Patienten ist CD 14/34, Marker für hämatopoetischer Vorläuferzellen, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen,

Granulozyten, dendritische Zellen, Langerhans'sche Zellen, Kupfferzellen und Monozyten-Leukämien exprimiert. CD 14/117 spart lediglich Endothelzellen aus und ist bei 2 von 26 Patienten nachzuweisen. HLA-DR, bei basophilen Granulozyten, Makrophagen, und aktivierten T-Zellen, aber ebenso bei Monozyten, Granulozyten, Kupfferzellen und Monozyten-Leukämien oberflächlich darstellbar, ist bei 23 von 26 Patienten vorhanden. CD 14/56 wieder auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen, und Monozyten-Leukämien, aber auch auf natürlichen Killerzellen, neuroektodermalen Zellen, Subpopulationen der T-Zellen nachzuweisen, ist bei 6 von 26 Patienten positiv. CD 14/4, Marker für Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Langerhans'sche Zellen, Kupfferzellen und Monozyten-Leukämien und T-Zellen, Subpopulation der Monozyten und kortikaler Thymuszellen ist bei keinem der 24 Patienten darstellbar. CD 14/38 exprimiert auf Plasmazellen, Thymozyten, B-Zellen, Monozyten, Vorläuferzellen, Makrophagen und Granulozyten ist bei 23 von 27 Patienten ausgeprägt.

4.3.1.1:

Abb.1

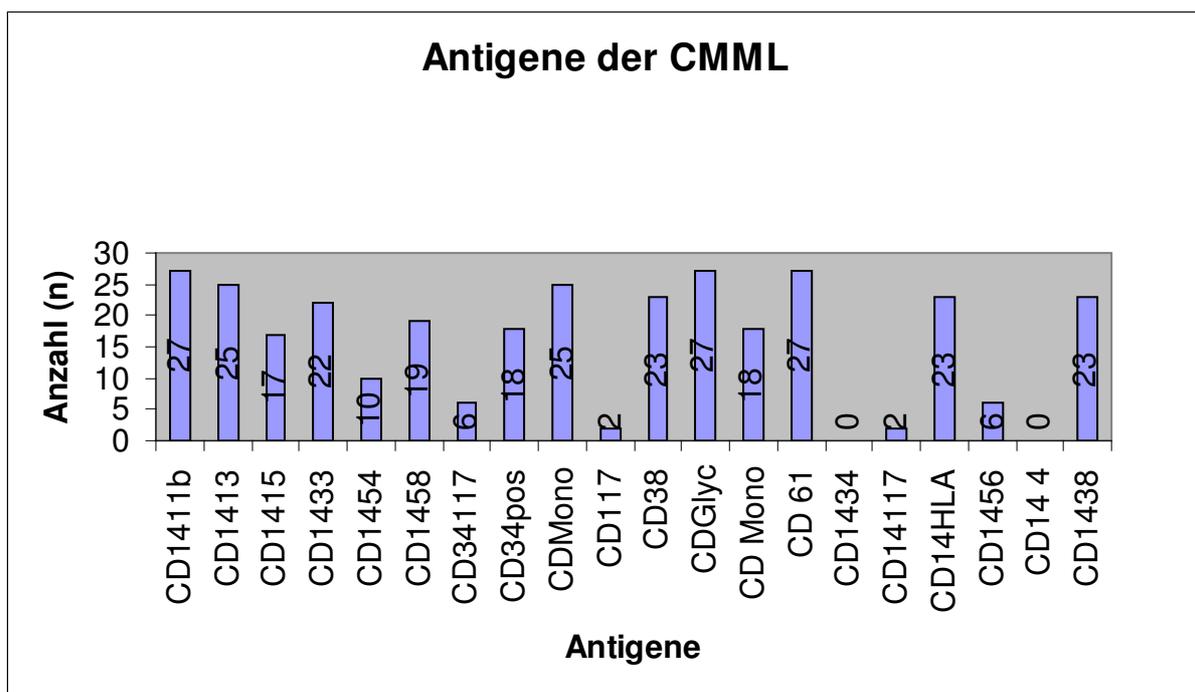
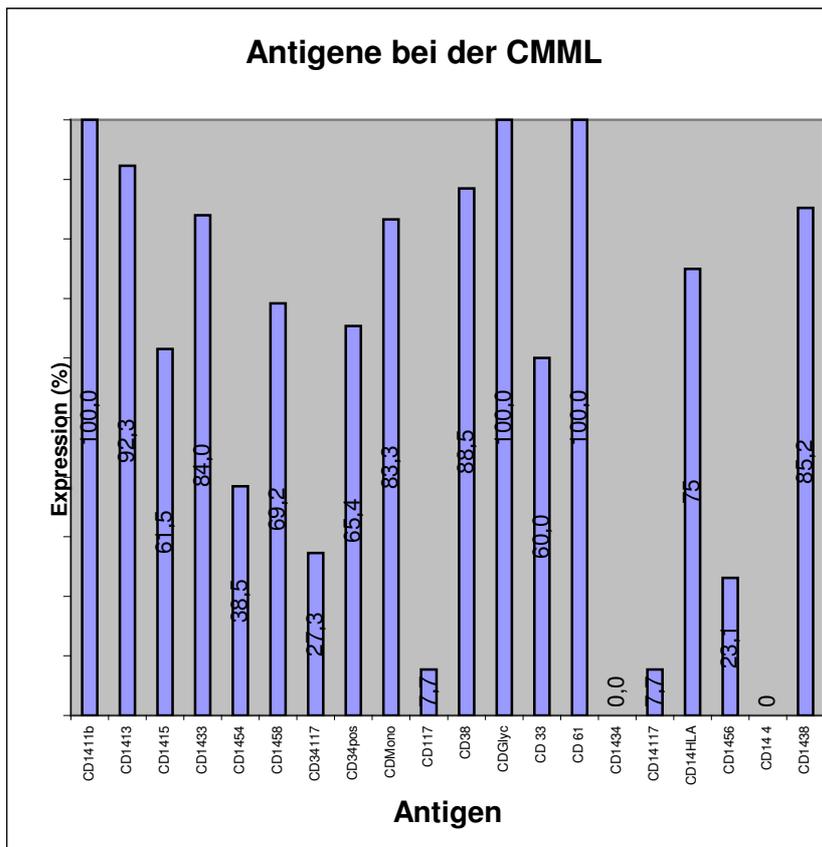


Abb.2:



Antigene	CMML pos. (%)
CD 14/11b	100,0
CD 14/13	92,3
CD 14/15	61,5
CD 14/33	84,0
CD 14/54	38,5
CD 14/58	69,2
CD 34/117	27,3
CD 34pos	65,4
CD Mono	83,3
CD 117	7,7
CD 38	88,5
CD Glyc.A	100,0
CD 33	60,0
CD 61	90,0
CD 14/34	0
CD 14/117	7,7
HLA- DR	75,0
CD 14/56	23,1
CD 14/4	0
CD 14/38	85,2

Im kryokonservierten Knochenmark der CMML-Patienten sind zu 100% CD 11b, der auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, und der zu 92,3% auf den Monozyten vorherrschenden CD 13 Marker, zu finden.

Der für die Zelladhäsion, Chemotaxis und Phagozytose neutrophiler Granulozyten typischer Oberflächenmarker CD 15 ist zu 61,5% nachzuweisen. Das Oberflächenantigen CD 33, dessen Funktion noch unbekannt ist, ist auf den Monozyten und deren Vorläuferzellen zu 84,0% vorhanden. CD 54, ein Molekül, welches nicht nur auf der Monozytenoberfläche, sondern auch auf aktiven Endothelzellen, T- und B-Zellen vorliegt, zeigt sich zu 38,5%.

Das Adhäsionsmolekül CD 58 ist zu 69,2% exprimiert. CD 34/117, auf myeloischen Vorläuferzellen, zeigt sich zu 27,3%. Mit einer fraglichen Adhäsionsfunktion ist der CD 34-Marker zu 65,4% bestimmt worden. CD Mono ist zu 83,3% auf der Oberfläche von Monozyten und Granulozyten exprimiert. Zur Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie zählt CD 117 und ist nur zu 7,7% vertreten. CD 38-Antigen herrscht auf B-Zellen und aktiven Keimzentrumzellen vor und weist eine Spezifität von 88,5% auf. CD Ery, oder auch CD Glyc A, Marker für Erythrozyten, ist zu 100% darstellbar. CD Myelo, exprimiert auf Vorläuferzellen, zeigt sich zu 60%. CD Mega, oder auch CD 61, ist auf Megakaryozyten oder der gereiften Zelle, den Thrombozyten, zu 90% nachzuweisen. CD 14/34, auf der hämatopoetischen Vorläuferzelle vorrangig, ist nicht exprimiert. CD 14/117 zeigt sich auch zu 7,7%, wie die isolierte Darstellung von CD 117. Als nicht CD-Antigen ist HLA-DR auf der Oberfläche von B-Zellen und follikulär dendritischen Zellen zu 75% exprimiert.

23,1% ist der Anteil von CD 56, der auf natürlichen Killerzellen, T-Zellen vom Subtyp und neuroektodermalen Zellen nachzuweisen ist. CD 14/4, auf den T-Helferzellen und als Subpopulation der Monozyten, ist nicht darzustellen. CD 38-Antigen herrscht auf B-Zellen, aber auch auf Monozyten exprimiert, und weist eine Spezifität von 85,2% auf.

4.3.2:

Immunphänotypisierung der AML

Bei der AML sind folgende Parameter bestimmt worden:

CD 14/11b, CD 14/13, CD 14/15, CD 14/33, CD 14/54, CD 14/58, CD 34/117, CD 34pos, CD Mono, CD 117, CD 38, CD Myel, CD 19, CD 7.

Folgende Verteilung zeigte sich hier bei 33 Patienten, die zur Untersuchung zur Verfügung standen: CD 14/11b ist bei 29 von 32 Patienten exprimiert, CD 14/13 bei 28 von 33 Patienten. CD 14/15 ist bei 32 von 33 Probanden und CD 14/33 bei 33 von 33 Probanden darstellbar.

CD 14/54 ist bei 24 von 28 Proben nachzuweisen, CD 14/58 bei 15 von 27 Personen. CD 34/117 ist nur bei 4 von 30 Proben positiv. CD 34 ist bei 13 von 33 Patienten exprimiert, CD Mono bei 26 von 30 Patienten. CD 117, auf Progenitor- und Vorläuferzellen, ist bei 5 von 29 Patienten positiv, CD 38 ist auf Plasmazellen, Thymozyten, aktive B und T-Zellen, Keimzentrumzellen, Monozyten und Progenitor- Vorläuferzellen, ist bei 30 von 30 Patienten exprimiert. CD Myel ist ein Zusammenschluß von myeloischen Zellen von CD 33 und CD 34 und ist bei 32 von 33 Patienten nachgewiesen. CD 19 auf Pan-B-Zellen, außer Plasmazellen, kommt bei 2 von 30 Patienten vor. CD 7 auf T-Zellen, Thymozyten, natürlichen Killerzellen und unreifen myeloischen Zellen ist bei 6 von 33 Probanden darstellbar.

Abb.1

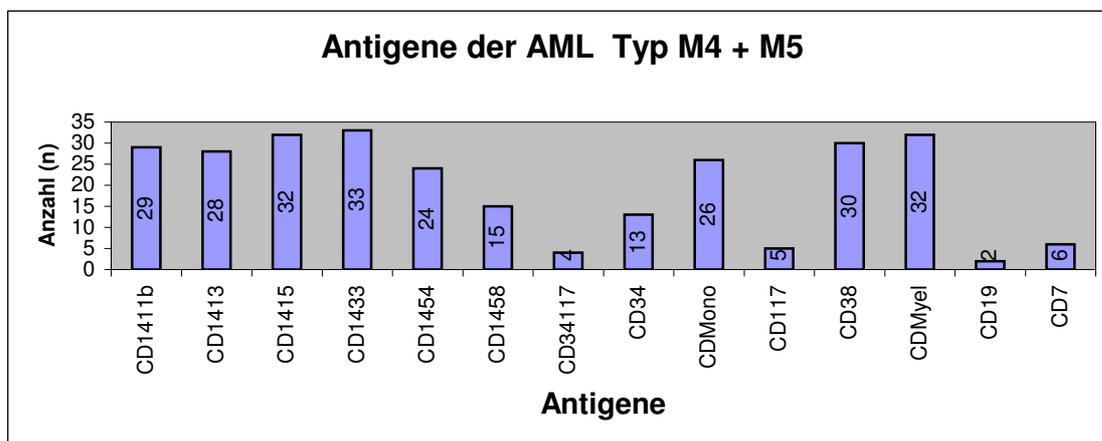
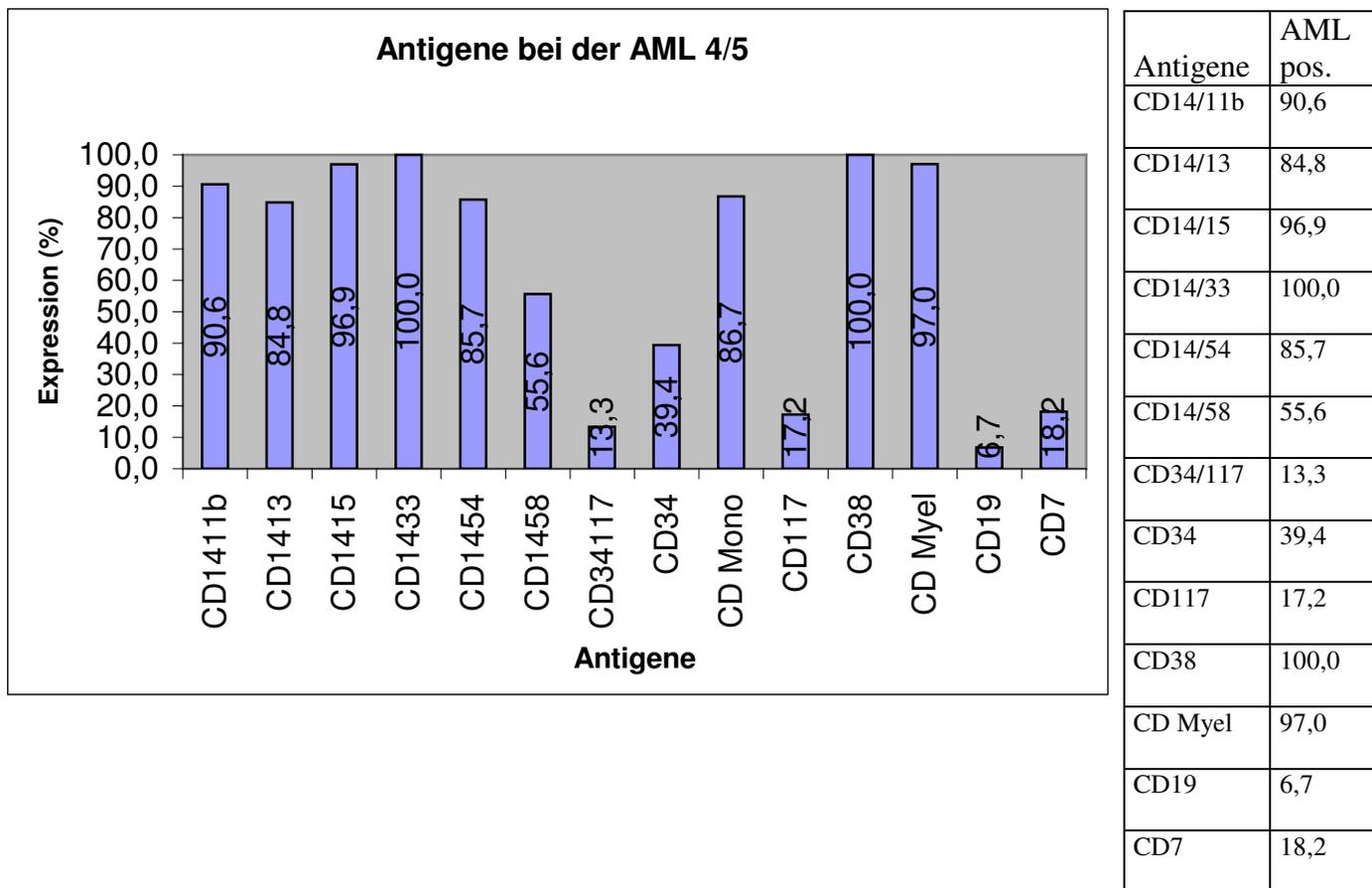


Abb.2:

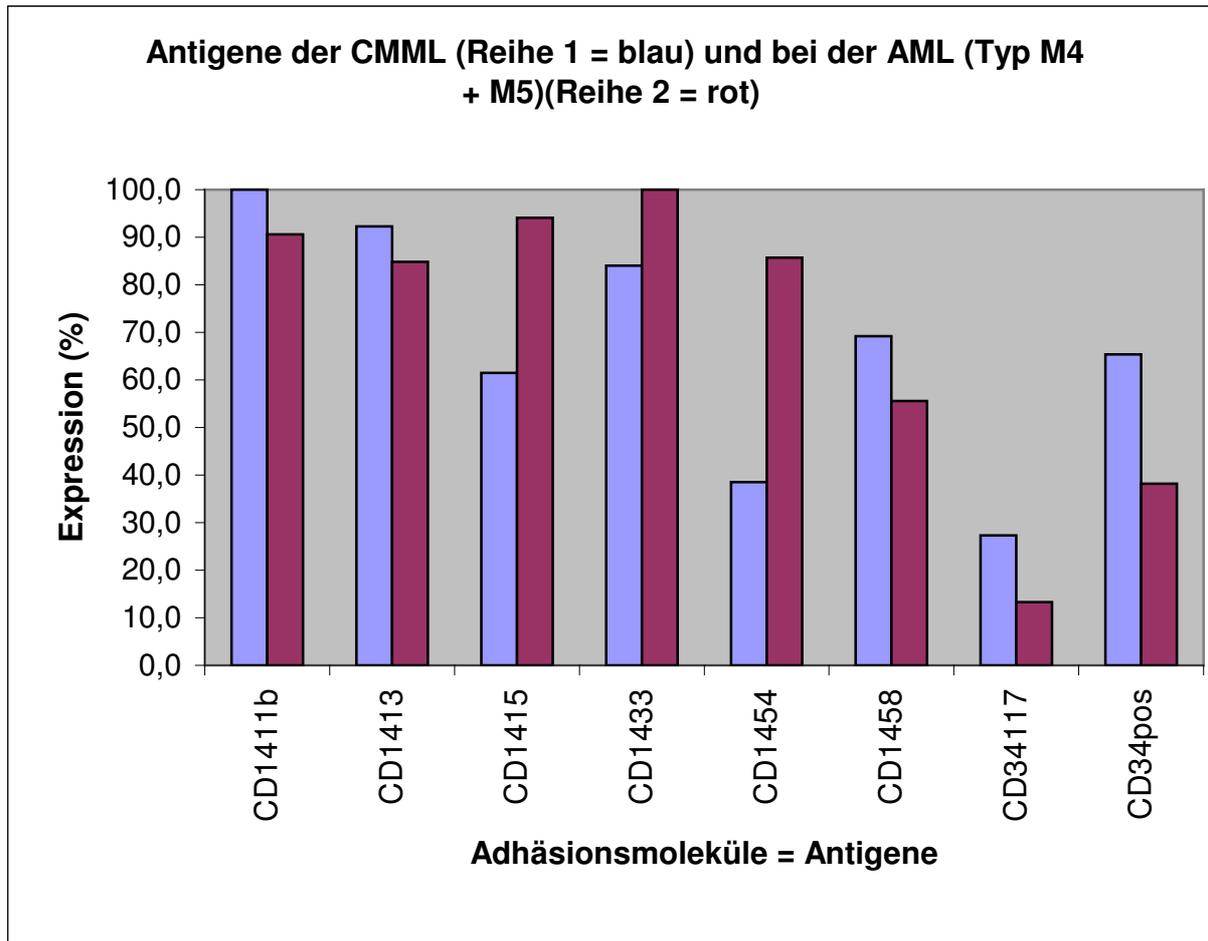


Bei gleichem Reaktionsansatz mit Knochenmark und Antigenen, nun aber bei der AML (M4 +M5), zeigen sich deutliche Unterschiede zur CMML:

Der Expression von CD 33 und CD 38 sind mit jeweils 100% erfolgt, CD 15 mit 94% und CD 11b mit 90,6%. Ebenso gleiche prozentuale Anteile erreichen CD 13 mit 84,8% und CD 54 mit 85,7%. Die Expression von CD 58 wird mit 55,6% dargestellt und CD 56 mit 50%. CD 34 weist eine Expression von 38,2% auf, während CD 117 mit 17,2% vertreten ist.

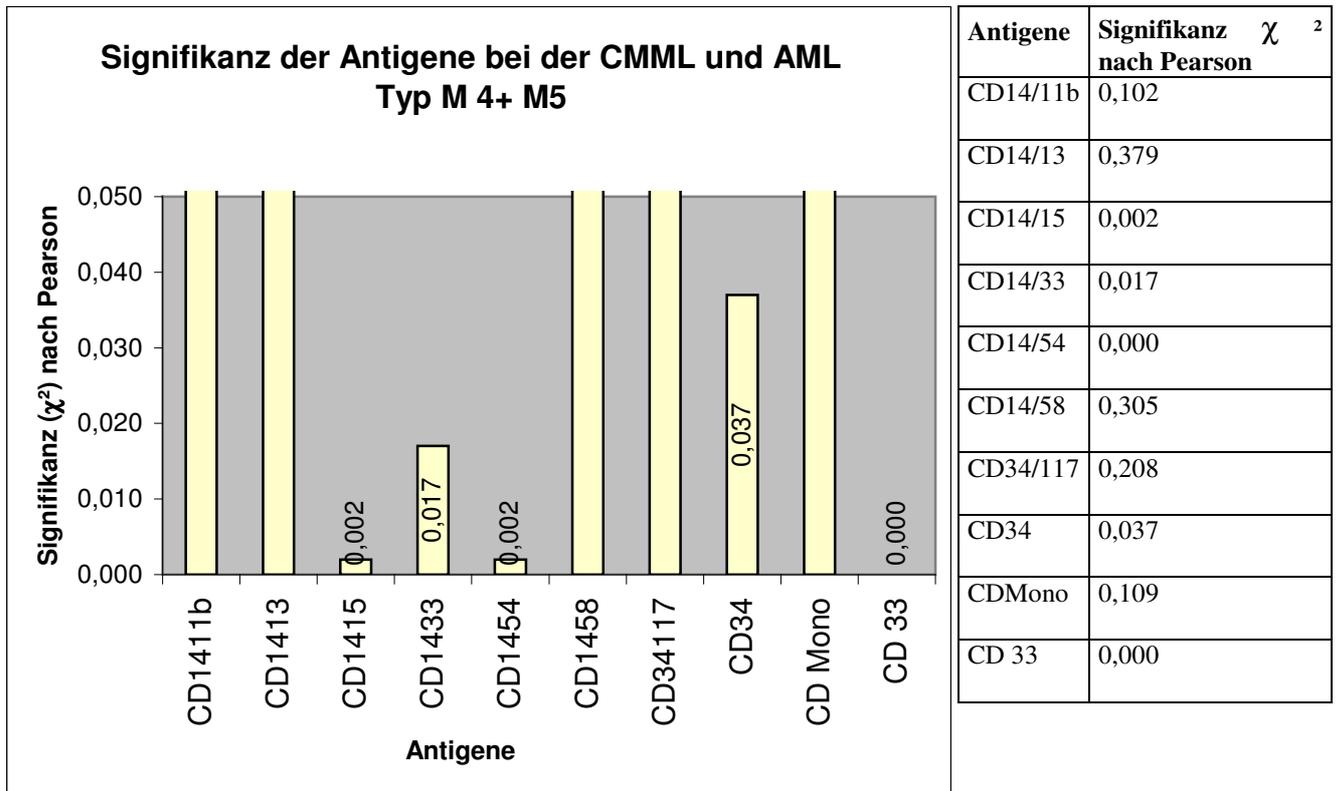
4.3.3.1 Antigenexpressionen der CMML und AML im Vergleich

Abb.3:



Um nun Unterschiede der untersuchten Parameter von CMML und AML Typ 4 +5 darzustellen, werden die Messdaten, die bei beiden Leukämieformen bestimmt worden sind, in Relation gesetzt und mit Hilfe des Programmsystems SPSS statistisch ausgewertet. Die Signifikanz p (χ^2 nach Pearson) $< 0,05$ ist aussagekräftig und zeigt einen bedeutenden Unterschied zur Differenzierung und Wichtigkeit der Parameter, die zur Diagnostik herangezogen werden können.

Abb.4:



Somit ergibt sich eine Signifikanz der Marker CD 14/54 ($p=0,0005$), CD 14/33 ($p= 0,017$), CD 14/15 ($p=0,02$), CD 14/38 ($p= 0,029$) und CD 34 ($p= 0,037$). Diese Oberflächenantigene eignen sich zur Differenzierung der CMML und AML Typ M 4+M 5, während Klinik und Blutbild ähnlich sein können.

5. Diskussion

Die chronischen myelomonozytären Leukämien sind Stammzellerkrankungen, die durch den Nachweis einer peripheren Monozytose von über 1000/ μ l, dem Vorliegen von dysplastischen Veränderungen mindestens einer Zellreihe im Knochenmark, dem Ausschluss eines Philadelphiachromosoms und einer Blastenexpansion bis zu 20 % in Blut und Knochenmark gekennzeichnet ist. Die CMML zeigt sowohl Charakteristika der myelodysplastischen als auch der myeloproliferativen Erkrankungen, vor allem, wenn es zu einer Leukozytose kommt. Häufig sind auch eine Splenomegalie und eine Hepatomegalie.

Die akute myelomonozytäre Leukämie ist vor allem dadurch definiert, dass mindestens 20 % medulläre Blasten und/oder über 20 % Blasten im peripheren Blut nachgewiesen werden können, die monozytären oder monoblastären Charakter haben. Um die akuten myelomonozytären von den anderen akuten Leukämien abgrenzen zu können, bedarf es mindestens der Durchführung einer Esterasefärbung. Durch diese enzymatische Färbung werden monoblastäre oder monozytär differenzierte Zellen von anderweitig differenzierten oder undifferenzierten Blasten abgegrenzt.

Bei der akuten Leukämie werden Oberflächenstrukturveränderungen anhand der Immunphänotypisierung nachgewiesen, die nicht bei der ausgereiften lymphatischen, monozytären oder myeloischen Zelle beobachtet werden.

Die FAB-Klassifikation stellt bisher die Grundlage der Einteilung akuter myeloischer Leukämien dar. Sie berücksichtigt unterschiedliche Differenzierungs- und Reifungsstadien, welche nach morphologischen und zytochemischen Kriterien definiert werden. In der letzten Modifikation von 1991 wurden auch einzelne immunophänotypische Kriterien für den Nachweis der Subtypen FAB M0-M7 aufgenommen. (Bennett 1991)

Die Abgrenzung der CMML von reaktiven Monozytosen einerseits, und die Abgrenzung der CMML von AMML andererseits, ist im Einzelfall sehr schwierig, da letztendlich nur der Nachweis von dysplastischen Veränderungen bzw. eine Blastenexpansion zytomorphologisch

zur Abgrenzung herangezogen werden kann. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, sich neuerer Methoden zu bedienen, um die Krankheitsbilder genauer charakterisieren zu können. Woodlock (27) stellte anhand von zwei Patienten die Nutzung der Immunphänotypisierung dar. Nicht nur zur Diagnostik, sondern auch zur Beobachtung des Therapieverlaufes, kann die Immunphänotypisierung genutzt werden. Der Therapieerfolg, aber auch ein Rezidiv, kann erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von 30 CMML und 33 AMML Patienten immunphänotypisch untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchung konnte ein typisch charakteristisches immunphänotypisches Profil der CMML erstellt werden. Es findet sich neben einer Koexpression von CD 14 /CD 11b bei den meisten Patienten eine Koexpression von CD 14/CD 13, CD 14/CD 15 und CD 14/CD 33.

Es finden sich charakteristische Marker von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, zudem finden sich Oberflächenmarker wie CD 15 in etwa 2/3 der Fälle, die für Zelladhäsion, Chemotaxis und Phagozytose charakteristisch sind. Nur ein kleinerer Teil der Monozyten exprimiert CD 34 und CD 117 als sehr unreife myeloische Vorläufermarker.

Eine Expression, die höher als 60% ist, gaben Mesarosova et al. 1995 (19) für CD 14, CD 65, CD 11b, CD 33, HLA-DR an. Eine geringe Expression wies CD 13 mit 33% auf.

Der Nachweis von CD 11b dient zum Ausschluss einer reaktiven Monozytose, jedoch aber nicht zur Abgrenzung einer AML Typ 4/5, da hier ca. 50% exprimiert sind (17). In weiteren Forschungsergebnissen stellte Ogata (28) 2004 in 90 untersuchten MDS-Fällen fest, dass mit einer Zunahme der Blasten im Knochenmark eine Veränderung der exprimierten Antigene einhergeht. Eine Zunahme von CD 7, CD 56, CD 117 ist gleichzeitig mit einer Abnahme von CD 10, CD 11 b und CD 15 verbunden. Ebenso zeigt er (32) in einer weiteren Arbeit in konzentrierten Blasten-Proben des Knochenmarks und des peripheren Blutes eine vermehrte Expression von CD 34, CD 38, HLA-DR, CD 13, CD 33, was auf myeloische Vorstufen hinweist. So werden in der Arbeit 5 CMML-Patienten erfasst, bei denen zu 100%

CD 13, CD 33, CD 34, HLA-DR, CD 38, CD 117 exprimiert werden. CD 11b und CD 15 wurden bei 40% nachgewiesen. Lymphogene Antigene fehlen fast vollständig. Nur CD 4 und CD 7 werden hier zu 40% erfasst.

Benesch (30) verweist auf Stetler-Stevenson (31), der in der Arbeit bei 78% der MDS-Patienten eine immunphänotypische Veränderung aufzeigt, die das monozytäre, das myeloische, oder beide Systeme betrifft. CD 13 und CD 16 weisen eine Änderung zu 23% auf, der Nachweis von CD 56 ändert sich bei reifen myeloischen Zellen zu 16%, bei Monozyten zu 17%. 69% der Patienten zeigten mehr als eine Anomalie.

Ogata (29) zeigte in einer Arbeit mit 116 MDS-Patienten, die entweder ein MDS oder eine sekundäre akute Leukämie vorwiesen, eine Häufung von CD 34, CD 38, HLA-DR, CD 13 und CD 33. So sind die MDS-Blasten in der Lage, Antigene der unreifen Stammzelle zu exprimieren, aber auch die der reifen myeloischen Zelle.

Die AML M4 ist durch die Expression der myeloischen Antigene CD 13 CD 33 und der monozytären Antigene CD 14, CD 4, CD 11b, CD 11c, CD 64 CD 36 und Lysozym differenziert. (20). Die AML M5 exprimiert variabel myeloische Antigene: CD 13, CD 33, CD 117 und monozytäre Marker: CD 14, CD 4, CD 11b, CD 11c, CD 64, CD 68, CD 36 und Lysozym. CD 34 ist häufig negativ, während CD 33 zu hohen Prozentsätzen exprimiert wird. In einigen Fällen werden die monozytären Antigene wie CD 14 nicht exprimiert, während CD 34, CD 64, CD 4 und CD 11c deutlich nachgewiesen werden.(20)

Das charakteristische Markerprofil der akuten myelomonozytären Leukämie unterscheidet sich ganz wesentlich durch den Nachweis von CD 14- und CD 33-Koexpression. Diese Markerkonstellation weist auf sehr unreife, stammzellnahe Zellpopulationen hin, die sich bei der CMML nicht so häufig finden. Zur Abgrenzung der CMML von der AMML können ebenfalls die Oberflächenmarkerexpression CD 14 und Koexpression CD 15 sowie CD 14/54 und CD 14/38 herangezogen werden.

Die AML M4, M5 ist immunologisch durch die Expression von Myeloperoxidase (zytoplasmatisch), CD 13, CD 33, CD w65 und /oder CD 117 (Oberfläche) definiert. Der Marker mit der besten Diskriminierungsfähigkeit ist die Myeloperoxidase = MPO. (25,26)

Oertel et al. (18) zeigte 1994 in einer Studie mit 7 CMML Patienten eine ca. 17% ige Expression von CD 34 pos. Zellen. Ein erhöhter Anteil der Promonozyten exprimiert CD 34. Dies bedeutet, dass die Promonozyten zu einem undifferenzierten CD 34 positiven Zellklon gehören.

CD 4 ist bei keinem der CMML-Patienten nachweisbar, da Monozyten während ihrer Reifung die myeloischen Anteile verlieren.

CD 117 wurde nur bei wenigen CMML Patienten nachgewiesen, d.h. die CMML Zellen haben eine gewisse Reifungsphase durchlaufen, und sind nicht mehr so undifferenziert.

Die Prognose abzuschätzen ist das Ziel der unterschiedlichen Score-Systeme. Unterschiedlich werden Klinik, Alter und Laborparameter gewichtet und als Prognoseparameter bewertet.

Der modifizierte Bournemouth Score (21), der Spanische Score (23), der MDAP-Score (22) und der Düsseldorfer Score (24) können zur Einschätzung der Überlebenszeit, nicht aber so gut für die Einschätzung der Häufigkeit in einen AML-Übergang herangezogen werden. Wichtig erscheint die Identifikation von Niedrig-Risikopatienten, bei denen eher zurückhaltend therapiert werden sollte. Über die oben genannten CMML spezifischen Scoring-Systeme hinaus können auch der IPSS und der kürzlich entwickelte WPSS (38) herangezogen werden; allerdings erscheint die Aussagekraft dieser Scores für die CMML begrenzt zu sein. (5.1 Tab.1)

Eine Neuentwicklung stellt der FCSS (2008) (5.1.Tab. 1) dar, der unter anderem flowcytometrische Ergebnisse in die Prognoseabschätzung einfließen lässt. Eine Evaluierung diese Scores steht aus.

5.1. Tabelle 1: Kriterien der Scoring-Systeme

Kriterien	FCSS	IPSS	WPSS
Alter	x		
Geschlecht	x		
Mittlere Überlebenszeit	x		
Mittlerer Zeitraum zwischen Diagnose und Transplantationstag	x		
WHO-Klassifikation der MDS-Formen	x		x
IPSS-Klassifikation nach Risikoeinschätzung	x		
Cytogenetische Klassifikation nach Risikoeinschätzung	x		
Graft versus host disease Prophylaxe	x		
Verwandter Spender mit HLA – Differenzierung	x		
Fremdspender mit HLA-Differenzierung	x		
Herkunft der Stammzelle	x		
Dauermedikation	x		
Anzahl der abnormalen Blasten in Prozent	x		
Dysplastische Myeloblasten im Knochenmark	x		
Knochenmarkblasten in Prozent		x	
Karyotyp		x	x
Anzahl der Zytopenien		x	
Transfusionserfordernis			x

Das flow cytometric scoring system (FCSS) korreliert mit dem IPSS, wie FCSS/IPSS, die Studie von Scott et al., belegt. (40)

Die Abgrenzung einer myeloproliferativen von der myelodysplastischen Variante der CMML anhand des Vorhandenseins einer Leukozytose von mehr als 12.000/ μ l, bzw. die Abgrenzung einer CMML1 von einer CMML2 in Abhängigkeit vom Blastenanteil $< 10 > \%$ im

Knochenmark, konnte zwar zur Prognoseevaluation herangezogen werden, hilft jedoch nicht zur Abgrenzung zur AMML und zu reaktiven Monozytosen weiter.

Die Markerkonstellationen sowohl der CMML als auch der AMML, die aufgrund der hier vorliegenden Analysen erstellt werden konnten, finden sich physiologischerweise nicht in Knochenmarkszellen, so dass auch eine Abgrenzung zur reaktiven Monozytose mit Hilfe dieses Markerprofils gelingen könnte. Hierzu wäre es erforderlich, Patienten mit reaktiven Monozytosen zu untersuchen. Systematische Untersuchungen zu dieser Fragestellung gibt es in der Literatur bislang nicht.

7. Literaturverzeichnis

1. Baudard-M; Delmer-A; Zittoun-R
Chronic myelomonocytic leukemia in adults
Pathol.-Biol.-Paris 9/1997 45(7):605-11

2. Bennett-JM; Catovsky-D; Daniel-MT; Flandrin-G; Gralnick-H; Sultan-C; Cox-C
The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulytic, atypical
Chronic myeloid and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-
American- British- Cooperative Leukaemia Group
Br-J-Haematol. 8/ 1994 87(4): 746-54

3. Germing-U; Strupp-C; Meckenstock-G; Giagounidis-A; Minning-H; Aul-C
Klinik, Morphologie und Prognose chronischer myelomonozytärer Leukämien
Medizinische Klinik 1999; 94:467-72 Nr.9

4. Groves-FD; Linet-MS; Devesa-SS;
Epidemiology of leukemia : overview and patterns of occurrence
Henderson-ES; Lister-TA; Greaves- MF (eds) : Leukemia. Saunders 1996
Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokio

5. Rinsky-RA; Smith-AB; Hornung-R; et al.
Benzene and leukemia, an epidemiologic risk assesment
1987 New England Journal Med. 316, 1044

6. Sandler-DP; Collmann-GW;
Cytogenetic and environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults
1987 American Journal Epidemiol. 126, 1027

7. Pedersen – Bjiergaard-J; Daugaard- G; Hansen-SW;
Increased risk of myelodysplasia and leukemia after etoposide, cisplatin and bleomycin for
Germ - cell Tumors
1991 Lancet, 338,359

8. Saarni-M; Linman-J
Praeleukemia, the haematological syndrome preceding acute leukemia
1973 American Journal Med. 55, 38

9. Bennett et al. 1976; 1985; 1985; 1991; FAB – Klassifikation akuter myeloischer
Leukämien

10. Greenberg, P., Cox C, Le Beau MM et al. 1997, International scoring system for
evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood 89, 2079

11. Raffael, A., 1988, Basic principles of analytical flow cytometry. Labor Med 11,89

12. Norman, H. Nie, USA, 1983 SPSS, Mc Graw Hill Book Company

13. Kaplan, E.L., Meier,P. 1958, Nonparametric estimations from incomplete observation.
J Am Stat Assoc.53,457

14. Gronowitz J.S. Kalländer C.F.R. Diderholm H. et al., 1984, Applikation of an in vitro assay for serum thymidinkinase. Results on viral disease and malignancies in humans. *Int J. Cancer*,33,5
15. Prockop D.J. Davidson W.D. 1964, A study of urinary and serum lysocyme in patients with renal disease. *N. Engl. J. Med.* 270, 269
16. Begemann, 1994, Shibata 1985, Atlas der klinischen Hämatologie, Springer Verlag Berlin- Heidelberg-New York
17. Meckenstock, Gerald 1997
Multiparametrische Charakterisierung und risikoassoziierte Klassifizierung der akuten myeloischen Leukämie der Erwachsenen, Habilitationsschrift Düsseldorf
18. Oertel, J., Oertel B., Beyer, J., Huhn, D., 1994
Ann Hematol. 1994 Feb.; 68 (2) : 77 - 80
Klinikum Rudolf Virchow- Charlottenburg, Freie Universität Berlin, Hämatologische Abteilung, Germany
19. Mesarsova, A., Hriwnakova, A., Kobusicka, A., Babusikova, O.
Neoplasma. 1995; 42 (1): 9-14
Chronic myeloid leukemia: Correlation between purinemetabolism enzyme activities and membrane immunophenotype
20. WHO Classification of Tumours, Pathology & Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 2001 E. S. Jaffe, N.L.Harris, H. Stein, J.W.Vardiman

21. Worsley, A., Oscier, D:G:, Stevens, J., et al. (1988) "Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemoth score gives the best prediction of survival", *British Journal of Haematology*, 68,17-21
22. Onida, F., Kantarijan,H.M., Smith, T.L., Ball, G., Keating, M.J., Estey, E.H. et al. (2002) "Prognostic factors in scoring system in chronic myelomonocytic leukemia", *Blood*, 99, 840-849
23. Gonzales-Medina, I., Bueno, J., Toorequebrada, A., Lopez, A., Vallespi,T. and Massague,I.(2002)"Two groups of chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leukemia Research*, 26,821-824
24. Aul, C., Gattermann, N., Heyll, A., Germing, U., Derigs, G. and Schneider, W. (1992) „Primary myelomonocytic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system", *Leukemia* 6, 52-59
25. Bene MC., Castoldi G.,Knapp W., Ludwig WD:, Matutes E., Ofaro A., van` t Veer MB., Proposals for the immunological classification of acute leukemias, *Leukemia* 1995; 9: 1783-1786
26. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of haematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996; 10 877-895

27. Woodlock, T.J., Seshi,B., Sham, R.L., Cyran, E.M., Bennett, J. M., Use of cell surface antigen phenotype in guiding therapeutic decisions in chronic myelomonocytic leukemia
Leukemia Research 1994, Mar; 18(3): 173-81.
28. Ogata K., Satoh C., Hyodo H., Tamura H., Dan K., Yoshida Y., Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia Research, 2004 Nov; 28(11): 1171-5
29. Ogata K., Yoshida Y., Clinical implications of blast immunophenotypes in myelodysplastic syndromes. Leukemia Lymphoma 2005 Sep; 46(9): 1269-74
30. Benesch,M., Deeg, H.J., Wells,D., Loken,M. Flow cytometry for Diagnosis and Assessment of Prognosis in Patients with Myelodysplastic Syndromes Hematology June, 2004 Vol. 9(3), pp. 171-177
31. Stetler-Stevenson, M., Arthur, D.C., Jabbour, N., Xie, X.Y., Molldrem, J., Barrett, A.J., Venzon, D., Rick, M.E., (2001) Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome, Blood 98, 979-987
32. Ogata K., Nakamura,K., Yokose, N. et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome Blood, 1.12.2002, V.100, Nr. 12
33. P. Valent, H.-P., Horny, J.M., Bennett, et al.
Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference
Leukemia Research 31 (2007) 727-736

34. L.Babicka, S.Ransdorfovva, J. Brezinova, et al.

Analyses of complex chromosomal rearrangements in adult patients with MDS and AML by multicolour FISH *Leukemia Research* 31 (2007) 39-47

35. DA. Wells, M. Benesch, MR.Loken, et al.

Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPPS and with outcome after hematopoitic stem cell transplantation , *Blood* 2003, 102: 394-403

36. M. Benesch, HJ. Deeg, D. Wells, et al.

Flow cytometric for diagnosis and assessment of prognosis in patients with myelodysplastic syndromes , *Hematology* 2004; 9:171-177

37. K. Ogata, Y. Kishikawa, C. Satoh, et. al.

Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low grade myelodysplastische syndromes, *Blood* 2006;108:1037-1044

38. L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, et al.

Time dependent prognostic scoring system for predicting survival and leucemic evolution in myelodysplastic syndromes, *Clinical Oncology* 2007; 25: 3530-3510

39. CS. Cutler, SJ. Lee, P. Greenberg, et at.

A. decision analysis of allogenic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome , *Blood* 2004; 104; 579-585

40. B.L. Scott, D.A. Wells, M.R. Loken , et al.
Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for post-transplant outcome in patients with MDS, Blood 2008-5-153700
41. T.Haferlach, A. Kohlmann, S. Schnittger, et al.
Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling
Blood 2005; 106; 1189-1198
42. C.Schoch, W. Kern, S. Schnittger, et al.
Karyotyp is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (AML) , Leukemia 2004; 18;12-125
43. M.R. Loken, A. v.d.Loosdrecht, K. Ogata, et al.
Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference
Leukemia research; Ja. 2008; 32(1): 5-17. Epub 2007 Jun 18
44. V.Pitini, C. Arrigo, D. Teti, et al.
Response to STI571 in chronic myelomonocytic leukemia with platelet derived growth factor beta receptor involvement: a new case report
Haematologica, Vol 88, Issue 5, ECR 18-ECR18 Copyright 2003 by Ferrata Storti Foundation
45. L.Bullinger, F.G. Rücker, S. Kurz, et al.
Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia

46. Tabelle von P.Greenberg et al.

Blood; 1997; 89, 2079-88 und List et al. 2004, Hematology, 297-317).

47. CM. Chillon, R. Garcia-Sanz, A. Balanzategui, et al.

Molecular characterization of acute myeloblastic leucemia according to the new WHO classification: a different distribution in Central-West-Spain

Haematologica, Vol 86, Issue 2, 162-166 Copyright 2001 by Ferrata Storti Foundation

48. U. Bacher, T. Haferlach, W. Kern, et al.

A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia

Haematologica, 2007, Vol. 92, Issue 6, 744-752 doi: 10.3324/haematol. 10869
Copyright 2007 by Ferrata Storti Foundation

49. U. Bacher, T. Haferlach, W. Kern, et al.

Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients, Blood, 1, March 2008, Vol.111, No 5, pp 2527-2537

50. H. Kiyoi, T.Naoe, S.Yokata, et al.

Internal tandem duplication of FLT3 associated with leucocytosis in acute promyelocytic leukemia: Leucemia-study Group of the Ministry of Health and Welfare

Leucemia, 1997; 11: 1447-1452

51. C.Schoch, W. Kern, S. Schnittger, et al.
Nucleophosmin gene mutations are predictors of favourable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype, *Blood*; 2005; 106:3733-3739
52. S. Fröhlich, R.F. Schenk, I. Stolze, et al.
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
53. S. Schnittger, U. Kinkelin, C. Schoch, et al
Screening for MLL-tandem-duplication in 387 unselected patients with AML identity a prognostically unfavorable subset of AML, *Leukemia* 2000; 14; 796-804
54. I. Rappoid, B.L. Ziegler, I. Kohler, et al.
functional and phenotypical characterization of cord blood and bone marrow subset expressing FLT3 (CD 135) receptor tyrosinkinase. *Blood*, 1997; 90:111-125
55. L. Bullinger, P. J.M. Falk
Gene Expression Profiling in Acute Myeloid Leukemia
Journal of Clinical Oncology,2005, Vol. 23, No 26 pp 6296-6305
56. U. Bacher, T. Haferlach, W. Kern, et al.
Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients
*Blood*2006, Vol. 107, No. 10 pp.3847-3853

57. E.J. Steer, N.C.P. Cross

Myeloproliferative disorders with translocations of 5q31-q35: role of the platelet-derived growth factor beta,

Acta Haematologica 2002, 107, 113-122

8. Abkürzungsverzeichnis

ALPC	atypical localisation of immature progenitor cell
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMML	Akute Myelomonozytäre Leukämie
BCR/ABL	Breakpoint Cluster Region, Fusionsgen auf Chromosom 22 = Philadelphia-Chromosom
CBF	Core Binding Factor
CBFb/MYH	Fusionsgen
CBFB/MYH11	Core Binding Factor/Myosin Heavy Polypeptid 11
CEBPA	CCAAT-Enhancer Binding Protein Alpha, Transskriptionsfaktor der Myelopoieseregulation, unterstützt Reifung von myeloischer Vorläuferzellen zu Granulozyten
CD	Cluster of differentiation
c-fms	Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), kodiert den Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor-Rezeptor
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
c-kit-Gene	Oberflächenantigen, zur Tyrosinkinase-Familie gehörend
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIF4EBP1	Eukarotic Translation Initiation Factor 4E
ETO	Fusionsprotein
ETV6/TEL	Transskriptionsfaktor
FAB	French-American-British (Klassifikationssystem)

FACScan	Fluoreszenzaktivierter Zellscanner
FCSS	flow cytometric scoring system
FGFR1	fibroblast- growth- factor- receptor-1
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLT 3 Gen	fms-Like Tyrosinkinase 3
FLT3-IDT	FLT3-Internal Tandem Duplication
GEP	gene expression profiling
GTPases	Guanosine-5'-triphosphate (GTP) activating proteins, hydrolisiert GTP
Hb	Hämoglobin
HLA	Human Leukozyte Antigen
HUMARA	Humane Androgenrezeptor-Gen
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IMP	Immature myeloic preliminary stage
inv	Inversion
IPSS	International Prognostic Scoring System
ITD	Internal Tandem Duplication
K-RAS	zählt zur Familie der GTPase, decodiert Proto-Onkogene
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
M1-M7	Akute Myeloische Leukämie FAB Subtyp M1-M7
MBL	Medullärer Blastenteil
MDAPS	M.D.Anderson Prognostic Score
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MDS-CMML	Myelodysplastische Variante der CMML
MLL	Mixed Lineage Leukemia Gen

MPD-CMML	Myeloproliferative Variante der CMML
MPO	Myeloperoxidase
NPM1	Nucleophosmin, nuclear-cytoplasmic shuttling factor
NW	Normalwert
N-RAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
p=n.s.	p-Wert ist nicht signifikant (>0,05)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Färbung
PBS	Phosphate buffert saline
PDGFRB	platelet –derived- growth- factor- receptor
PE	Phycoerythrin
PDPK1	Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase
PLT	Platelets = Thrombozyten
PML/RARa	Chimeres Protein
q	langer Arm eines Chromosoms
RA	refraktäre Anämie
RAS	Rat Sarcoma, Proto-Onkogen
RAEB	refraktäre Anämie mit Vermehrung von Blasten
RAEB-T	refraktäre Anämie mit Vermehrung von Blasten in Transformation
RARS	refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RUNX1/CBFA2T1	Runt Related Transcriptions-Factor
SAM	Significance Analysis of Microarrays
sAML	Sekundäre AML
SSC	right angle light scatter
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

t-AML	therapy-related AML
TNFR1	Tumor-Nekrose Faktor
TK	Thymidinkinase
TKD	Tyrosin Kinase Domaine
t-RARS	Trilineäre refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
t	Translokation
WBC	White Blood Cell
WHO	World Health Organization
WPSS	WHO prognistic scoring system

8. Lebenslauf

Name, Wohnort		Angelika Neuenfeld Steinhauser Bergstr. 37 58332 Schwelm
Geb.-Tag, -Ort Fam.-Stand		12.05.1961, Schwelm verh. seit 1985 1 Tochter
Schulbildung	11.09.1967- 30.06.1971 15.08.1971- 08.06.1977 01.08.1984 - 15.05.1988	Grundschule Schwelm Realschule Schwelm - Mittlere Reife - Abendgymnasium Wuppertal - Abitur -
Berufsausbildung	01.07.1977- 28.05.1980 01.07.1980- 01.07.1982	ZA Dr. Engelke, Schwelm -Zahnarthelferin Klinikum Wuppertal -MTA, Fachrichtung Labor
Studium	15.04.1991- 31.10.2000	Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Beruflicher Werdegang	15.11.2000 - 15.05.2002	AIP in der Anästhesie Johanniter KH Radevormwald
	15.06.2002 - 30.06.2003	Assistentin in der Anästhesie des Ev.KH Hagen Haspe
	seit 01.07.2003	Assistentin in der Anästhesie des Helios-Klinikums Schwelm
	11.03.2006	Facharztanerkennung für Anästhesiologie
	24.06.2006	Erlangung der Zusatzbezeich- nung für Akupunktur
	07.06.2008	Erlangung der Zusatzbezeich- nung für Palliativmedizin

Schwelm, den 1.12.2008

9. Zusammenfassung

Die chronische myelomonozytäre Leukämie ist eine seltene hämatologische Erkrankung älterer Menschen mit dem Kennzeichen von einer Vermehrung ausgereifter Monozyten im Knochenmark und peripheren Blut; Übergänge in eine AML (Akute Myeloische Leukämie) sind möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass der Düsseldorfer Score, der modifizierte Bournemouth Score, der M.D.Anderson Prognostic Score und der spanischer Score zur Abklärung der Überlebenswahrscheinlichkeit, nicht aber des Risikos des AML-Übergangs verwendet werden können.

Ein weiterer Aspekt der Differenzierung der CMML (Chronische Myelomonozytäre Leukämie) mit ihren Subtypen und Abgrenzung zur AML bietet die Durchflußzytometrie mit dem Nachweis der zelleigenen Oberflächenantigene = CD (Cluster of differentiation).

Die Expression von CD 14 zusammen mit CD 61 und CD 33 und die Koexpression von CD 14 und CD 11b erwiesen sich als charakteristisch für die CMML. Eine geringe Koexpression von CD 14/117, CD 14/34, CD 14/4 werden nachgewiesen. Aufgrund dieses Expressionsmusters kann die CMML als Stammzellerkrankung auf der Stufe der myelomonozytären Progenitorzelle verstanden werden. Diese Befunde erlauben eine Abgrenzung der CMML von akuten Leukämien des Subtyps FAB M4/M5 (French-American-British (Klassifikationssystem)).

Die akuten monozytären Leukämien sind immunphänotypisch gekennzeichnet:

- a. deutliche Expression von CD 11b, CD 14/33, CD 14/15, CD 14/54, CD 13, CD 38
- b. mäßige Expression von CD 34 und CD 58, CD 117
- c. Nachweis von Adhäsionsmolekülen
- d. zytoplasmatischer Nachweis von Myeloperoxydase

Weitere Untersuchungen zur Abgrenzung zur CMML und reaktiven Monozytosen stehen aus.

