

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Haas

Klinischer Verlauf und molekulare Charakteristika von Patienten mit
Myelodysplastischen Syndromen und einer leichten Monozytose

Dissertation

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

Vorgelegt von
Franziska Antonia Frank
(2019)

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. U. Germing

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. S. Biesterfeld

Für meine Eltern

Ein Teil der Arbeit unter folgendem Titel veröffentlicht:

Leukemia Research, Volume 65, Supplement 1, 2 2018, pg. 1-4

Myelodysplastic syndromes without peripheral monocytosis but with evidence of marrow monocytosis share clinical and molecular characteristics with CMML (E. Schuler, F. Frank, B. Hildebrandt et al.)

Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden MDS-Patienten mit einer Monozytenpopulation im Knochenmark zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt und einer leichten Monozytose, die die Diagnosekriterien für eine CMML nicht erfüllten, mit MDS-Patienten ohne diese Charakteristika verglichen. Das Ziel war zu eruieren, ob sich diese Patientengruppe im Hinblick auf ihre Klinik, ihre Transformationsraten in eine CMML, AML sowie andere höhergradige MDS-Subtypen und ihre molekulare Charakteristika unterscheiden. Mögliche Unterschiede des Überlebens aufgrund etwaiger unterschiedlicher Progresswahrscheinlichkeiten wurden ebenfalls untersucht.

Die Patientendaten wurden aus dem MDS-Register der Heinrich-Heine-Universität akquiriert. Für die molekulargenetische Untersuchung wurde das Illumina Myeloid Panel verwendet. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer bereits vorhandenen Monozytenpopulation zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt deutlich häufiger in eine CMML transformierten als Patienten ohne diese Population. Der Prozentsatz für Patienten mit Monozytenpopulation betrug 32,1% im Vergleich zu 8,9% für Patienten ohne Monozytenpopulation. Auf das kumulative Überleben der Patienten hatte die deutlich höhere CMML-Transformationsrate keinen signifikanten Einfluss.

Eine molekulargenetische Untersuchung auf CMML-typische Mutationen (ASXL1, RUNX1, NRAS, SRFS2, SETBP1, TET2) wurde bei Stichproben (n=20) der beiden Patientengruppen durchgeführt. Bei 15 Patienten mit Monozytenpopulation und bei 9 Patienten ohne Monozytenpopulation fand sich mindestens eine Mutation. Man kann daher vermuten, dass CMML-typische Mutationen frühzeitig, also bereits vor der endgültigen CMML-Transformation, aufzufinden sind. Eine Verifizierung dieser Vermutung könnte in einem zukünftigen Projekt mit einem größeren Patientenpool erfolgen, um ein „Small Study Bias“ ausschließen zu können.

Die zytomorphologische Untersuchung sollte im Diagnosealgorithmus der MDS und CMML einen höheren Stellenwert bekommen, weil Patienten mit einer bereits vorhandenen Monozytenpopulation im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose ein erhöhtes Risiko, in eine CMML zu transformieren, aufweisen.

Die Daten weisen zudem darauf hin, dass die Erkrankungen MDS und CMML keine streng abgrenzbaren Entitäten sind, sondern ein biologisches Kontinuum von myeloischen Stammzellerkrankungen mit unterschiedlichen molekularen Charakteristika darstellen.

Der Einfluss CMML-typischer Mutationen auf die Charakteristika von Patienten mit verschiedenen myeloischen Neoplasien könnte in zukünftigen Projekten mit einem größeren Patientenpool untersucht werden, um mögliche molekulargenetische Risikofaktoren von Progressen abschätzen zu können.

Summary

This medical thesis compared two different patient groups with MDS. One group of patients had a monocytic population in the bone marrow at the time of the initial MDS diagnosis and a slight monocytosis, which did not fulfil the diagnostic criteria for a CMML. The second group was the control group and had none of the aforementioned characteristics. The aim was to find out whether the patient groups differed in their clinical appearance, their rate of transformation into a CMML, an AML or a different high-grade MDS subtype and their molecular characteristics. It was also investigated, if these patients had different probabilities of survival because of possible varying probabilities of progress.

Patient data were drawn from the MDS-registry of the Heinrich-Heine-University. The Illumina Myeloid Panel was used for the molecular analysis.

It was shown that patients with an existing monocytic population in the bone marrow at the time of the initial MDS diagnosis transformed significantly more often into a CMML than patients without this population. The rate for patients with a monocytic population was 32,1% compared to 8,9% for patients without a monocytic population. This significant higher rate of transformation (into a CMML) had no significant effect on cumulative survival.

A molecular analysis of CMML-typical mutations (ASXL1, RUNX1, NRAS, SRSF2, SETBP1, TET2) was run for a random sample (n=20) of both patient groups. At least one mutation was found in 15 patients with a monocytic population and 9 patients without monocytic population. These data show that CMML-typical mutations appear early, i. e. before the actual transformation in a CMML. To verify this hypothesis, a molecular analysis should be run on a bigger pool of patients to exclude a possible small study bias.

The cytomorphologic examination should be valued higher in the algorithm of the CMML diagnosis, because MDS patients with an already existing monocytic population (at the time of the first MDS diagnosis) have an increased risk of developing a CMML.

Furthermore the data indicates that MDS and CMML are not two strictly separate disease entities, but a biological continuum of myeloid stem cell diseases with different molecular characteristics.

The influence of CMML-typical gene mutations on the characteristics of patients with different myeloid neoplasms could be explored in a future research project on a bigger pool of patients.

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ASXL1	Additional sex combs like 1
BCR	Breakpoint cluster region
C	Cytosin
CML	Chronische Myelozytäre Leukämie
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
CFU	Colony forming unit
CPSS	CMML-specific prognostic scoring system
Del.	Deletion
FAB	French American British
G	Guanin
Gra.	Granulozyten
Hb	Hämoglobin
HD	Hämorrhagische Diathese
IPSS	International prognostic scoring system
JAK2	Janus kinase 2
α -KG	α -Ketoglutarat
KM	Knochenmark
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologe
LK	Lymphknoten
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MD	Myelodysplastisch
MDS	Myelodysplastische Syndrome
MDS-ED	Myelodysplastische Syndrome mit Blastenexzess

MDS-MLD	Myelodysplastische Syndrome mit multilinearer Dysplasie
MDS-RS	Myelodysplastische Syndrome mit Ringsideroblasten
MDS-ULD	Myelodysplastische Syndrome mit unilinearer Dysplasie
MDS-U	Unklassifizierbare myelodysplastische Syndrome
MLL	Lysine (K)-specific methyltransferase 2A
Mono.	Monozyten
MP	Myeloproliferativ
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homologe
n.s.	nicht signifikant
Pat.	Patient
PB	Peripheres Blut
pre-mRNA	Precursor messenger ribonucleic acid
Q	Langer Chromosomenarm
R	retrospektiv
RA	Refraktäre Anämie
RAEB (-I/-II)	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess Typ I bzw. II
RAEB-T	Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation
RARS(-T)	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (in Transformation)
RAS	Rat sarcoma
RCMD	Refraktäre Cytopenie mit multilinearer Dysplasie
RNA	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RUNX1	Runt related transcription factor 1
SEPT2	SET pseudogene 2

SETBP1	SET binding protein 1
SLD	Single lineage dysplasy
SRF2	Serum response factor 2
SRFS2	Serin/Arginin rich splicing factor 2
STAG2	Stromal antigen 2
T	Thymin
TET2	Tet methylcytosin dioxygenase 2
Thr.	Thrombozyten
t-MDS	therapieinduzierte Myelodysplastische Syndrome
Tp53	Tumor protein 53
WBC	White blood bells (= weiße Blutzellen, Leukozyten)
WHO	World Health Organisation

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Minimale diagnostische Kriterien des MDS	5
Tabelle 2 MDS-Subtypen nach WHO 2016.....	11
Tabelle 3 Spanisches zytogenetisches Risiko-Stratifikationssystem	16
Tabelle 4 Mutationskategorien bei der CMML.....	16
Tabelle 5 CMML-Subtypen nach der überarbeiteten Version von 2016.....	19
Tabelle 6 Vergleich der klinischen und epidemiologischen Parameter der Patienten mit und ohne Monozytenpopulation	27
Tabelle 7 Progressraten der unterschiedlichen Progressarten von Patienten mit und ohne Monozytenpopulation	32
Tabelle 8 Molekulare Charakteristika von Patienten mit Monozytenpopulation....	35
Tabelle 9 Molekulare Charakteristika von Patienten ohne Monozytenpopulation.	36
Tabelle 10 Gegenüberstellung der molekulargenetischen Ergebnisse	37
Tabelle 11 Klinische und epidemiologische Daten der kleineren Untersuchungsgruppe.....	48
Tabelle 12 Molekulargenetische Ergebnisse der kleineren Untersuchungsgruppe	51

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mutationsformen bei Genen.	7
Abbildung 2 CMML-Progressanteil der Patienten mit Monozytenpopulation.....	29
Abbildung 3 CMML-Progressanteil der Patienten ohne Monozytenpopulation.	30
Abbildung 4 AML-Transformation von Patienten mit Monozytenpopulation.....	31
Abbildung 5 AML-Transformation von Patienten ohne Monozytenpopulation.....	31
Abbildung 6 Vergleich der Progressraten (in Prozent) von Patienten mit und ohne Monozytenpopulation.	33
Abbildung 7 Kumulatives Überleben der Patienten mit und ohne Monozytenpopulation im Vergleich.....	38
Abbildung 8 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit einem Progress in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp.	39
Abbildung 9 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit einem Progress in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp.	40
Abbildung 10 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne AML-Übergang.....	41
Abbildung 11 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit und ohne AML-Übergang.....	42
Abbildung 13 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation und einem Progress im Verlauf.....	44
Abbildung 14 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne Progress jeglicher Art.....	45
Abbildung 15 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit und ohne Progress jeglicher Art,.....	46
Abbildung 16 Progressraten der kleineren Untersuchungsgruppe.....	49

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
I. Abkürzungsverzeichnis	I
II. Tabellenverzeichnis.....	IV
III. Abbildungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 MDS.....	1
1.1.1 Ätiologie	2
1.1.2 Epidemiologie.....	3
1.1.3 Klinik	3
1.1.4 Diagnostik.....	4
1.1.5 MDS-Subtypen.....	10
1.1.6 Verlauf.....	12
1.2 CMML	13
1.2.1 Ätiologie	13
1.2.2 Epidemiologie	14
1.2.3 Klinik	14
1.2.4 Diagnostik.....	14
1.2.5 CMML-Subtypen	18
1.2.6 Verlauf.....	19
2 Zielsetzung/Fragestellung.....	21
3 Methoden	22
3.1 Ethikvotum	22
3.2 Patienten.....	22
3.3 Datenrecherche	22
3.4 Verlauf	24
3.5 Molekulargenetische Untersuchung.....	24
3.6 Statistik	25
4 Ergebnisse	26
4.1 Patientendaten der größeren Untersuchungsgruppe.....	26

4.1.1	Klinische und epidemiologische Parameter	26
4.1.2	Progress	28
4.1.3	Progress in eine AML.....	30
4.1.4	Vergleich der Progressraten	32
4.1.5	Molekulargenetische Untersuchung.....	33
4.1.6	Kumulatives Überleben	37
4.2	Patientendaten der kleineren Untersuchungsgruppe mit verfeinerten Auswahlparametern	46
4.2.1	Klinische und epidemiologische Parameter.....	47
4.2.2	Progress	48
4.2.3	Molekulargenetische Untersuchung.....	49
4.3	Fazit der Ergebnisse	52
5	Diskussion	53
5.1	Progress in eine CMML.....	53
5.2	Progress in eine AML	55
5.3	Molekulare Charakteristika.....	56
5.4	Follow-Up.....	59
5.5	Ausblick.....	60
IV.	Literatur- und Quellenverzeichnis	61
V.	Danksagung	A

1 Einleitung

1.1 MDS

Der Begriff Myelodysplastische Syndrome (im folgenden MDS genannt) ist ein noch verhältnismäßig junger Begriff. Er wurde zum ersten Mal von John Bennett vor 42 Jahren (1976) in der FAB-Klassifikation (French American British-Klassifikation) verwendet, um verschiedene klonale, dysplastische Erkrankungen des Knochenmarkes beschreiben und sortieren zu können. (1) In den Zeiten vor der Definition der MDS dienten Begriffe wie z.B. „Präleukämie“ oder „subakute Leukämie“ zur Beschreibung dieser Knochenmarkserkrankungen mit einhergehender ineffektiver Hämatopoese. Solange wurden sie auch nicht als eigenständige Erkrankungen betrachtet. (1) Welche Knochenmarkserkrankungen zu den MDS gerechnet wurden bzw. werden, veränderte sich im Laufe der Zeit. So wurde in der ersten Klassifikation des FAB-Systems die chronische myelomonozytäre Leukämie (im folgenden CMML genannt) zu den MDS gezählt. (2, 3) Seit 2001 wird die CMML allerdings zu den myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien (MDS/MPN) gerechnet. (2, 3) Bei diesen bereits erwähnten Erkrankungen, die die MDS zusammenfassen, sind die hämatopoetischen Stammzellen betroffen, wodurch es zu einem dysfunktionalen Ablauf der Hämatopoese kommt. (2) Aus diesem Grund finden sich häufig im peripheren Blutbild Zytopenien, während das Knochenmark meist normo- bis hyperzellulär ist. (2) (4) Im Gegensatz dazu finden sich bei einer CMML auch proliferative Subformen, die mit einer Leukozytose statt einer Leukopenie einhergehen. (5) Weiterhin gibt es auch Patienten mit MDS, deren Knochenmark hypozellulär imponiert. (6) Die Definition eines hypozellulären Knochenmarkes ist altersabhängig. (6)

Bei den Erkrankungen der MDS ist die myeloische Stammzelllinie erkrankt. Es können Dysplasien in allen drei myeloischen Linien, also der erythro-poetischen, der granulopoetischen oder der megakaryopoetischen Linie, vorkommen sowie auch nur eine oder zwei myeloische Linien betroffen sein.

Weiterhin charakteristisch für diese Syndrome ist ein erhöhtes Risiko der betroffenen Patienten, im Verlauf eine akute myeloische Leukämie (im folgenden kurz AML genannt) zu entwickeln. (2) Das AML-Risiko beträgt circa 30%. (4)

Die MDS-Subtypen unterscheiden sich im Bezug auf Blastengehalt, klinische Zeichen, molekulargenetische und chromosomale Veränderungen sowie im medianen Überleben und in ihrem AML-Progress-Risiko. (2) Die Subtypen haben auch ein unterschiedliches Ansprechen auf Therapien. (7)

1.1.1 Ätiologie

Die Ätiologie des MDS ist noch nicht geklärt. Es werden bislang eine primäre und eine sekundäre Form des MDS unterschieden. (2)

Ein sekundäres MDS kann die Folge einer durchgemachten Chemo- und/oder Radiotherapie sein. (2) Diesen Typ kann man auch als therapieinduziertes MDS (t-MDS) bezeichnen. Therapieinduzierte MDS-Formen machen circa 10% aller MDS-Erkrankungen aus. In Japan sind es aufgrund der Folgen der Atombomben von Nagasaki und Hiroshima 20%. (8) Ebenso kann eine mutagene Wirkung durch Umweltnoxen ausgelöst werden. (2)

Bei Patienten unter vierzig Jahren mit MDS können auch kongenitale Konstellationen wie die Trisomie 21 oder die Fanconi-Anämie als Ursache in Betracht gezogen werden. (4)

Mittlerweile gibt es Studien zur Inzidenz von MDS bei Patienten, die einer ionisierenden Strahlung ausgesetzt waren. Beispielsweise zeigt die Studie von Iwanaga M et al einen signifikanten Anstieg an MDS bei Patienten, die der (Nach-) Strahlung der Nagasaki-Atombombe ausgesetzt waren. (9) Diese Studie brachte auch eine Korrelation der Inzidenz mit der Strahlungsdosis zu Tage, d.h. eine

höhere Strahlungs-dosis führt zu einer erhöhten Inzidenz von MDS und gleichzeitig auch zu komplexen Chromosomenaberrationen. (9)

1.1.2 Epidemiologie

Das MDS betrifft vorwiegend Menschen im höheren Lebensalter. (1) In den frühen 1980er Jahren gab es einen Anstieg der Inzidenz des MDS. Dies war dadurch zu erklären, dass ab den 80er Jahren die Knochenmarkspunktionen zur Abklärung von Zytopenien zunahmen. (1) Die Inzidenz der neuerkrankten Patienten mit MDS, die im Düsseldorfer MDS-Register gelistet sind, ist allerdings seit den 90er Jahren stabil. (1) Die Inzidenz ist auch altersabhängig. So steigt sie von 4,9/100.000 Einwohnern unter allen Altersgruppen auf über 24,5/100.000 Einwohnern bei Patienten über 70 Jahre. Das mediane Erkrankungsalter beträgt circa 71 Jahre. Die Prävalenz betrug vor sieben Jahren (2011) 7/100.000 Einwohner. (10) Männer sind von der Erkrankung häufiger betroffen als Frauen (54% zu 46%). (10)

1.1.3 Klinik

Die Klinik bei MDS ist sehr vielfältig und wird durch die peripheren Zytopenien der betroffenen Zelllinien beeinflusst. (11)

Abhängig davon, welche myeloische Linie betroffen ist, unterscheidet sich die klinische Präsentation. Ist die erythropoetische Linie betroffen, stehen die Anämiezeichen im Vordergrund. Zu diesen Zeichen gehören beispielsweise Müdigkeit, Konzentrationsstörungen und Dyspnoe. Bei einer Leukozytopenie steht die Infektanfälligkeit im Vordergrund. (11) Eine Thrombozytopenie führt zur hämorrhagischen Diathese, wobei besonders Petechien charakteristisch sind. (11) Weiterhin ist auch ein schleichender Krankheitsbeginn kennzeichnend für ein MDS. (11)

Dabei gibt es auch Patienten, deren MDS als Zufallsbefund entdeckt wird. Diese klinisch unauffälligen Patienten machen ca. 50% aller MDS-Patienten aus. (11)

Häufigste Todesursachen von Patienten mit MDS sind, ausgelöst durch die peripheren Zytopenien, Blutungen oder Infekte sowie ein Progress in eine AML. (11) Insgesamt sterben bis zu 40% der MDS Patienten an Blutungen und/oder Infekten. (2)

1.1.4 Diagnostik

Bei den bereits erwähnten klinisch inapparenten MDS-Patienten fällt häufig bei Routinelaboren eine Anämie auf. (12) Diese Anämie ist typischerweise normochrom, makrozytär und mit erniedrigten Retikulozyten als Ausdruck der ineffektiven Hämatopoese. (12) Zum weiteren diagnostischen Ablauf gehört der Ausschluss einer Anämie durch Spurenelement- /Vitaminmangel und ein Differentialblutbild. (12)

Wichtig für die weiterführende Diagnostik ist auch die Zytologie und Morphologie der Blutzellen sowie eine Knochenmarksuntersuchung. (12) Hier wird das Knochenmark sowohl zyto- als auch histomorphologisch untersucht. (12) Zwei weitere wichtige diagnostische Schritte sind die zytogenetische und die molekulargenetische Untersuchung der dysplastischen Zellen. (12)

Für die MDS wurden 2007 von der International Working Conference minimale diagnostische Kriterien aufgestellt, die in die Gruppen A „Diagnostische Basiskriterien“, Gruppe B „MDS-bezogene, spezifische diagnostische Merkmale und Gruppe C „Ergänzende Merkmale für Patienten, bei denen die Kriterien A und B erfüllt sind“, aufgeteilt werden können. (13) Tabelle 1 zeigt diese Kriterien auf.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Konstante Zytopenien (>6 Monate) (4) <ul style="list-style-type: none"> - Hb < 11g/dl - Neutrophile < 1,5 G/l - Thrombozyten < 100 G/l 	Dysplasiezeichen <ul style="list-style-type: none"> - jeweils >10% in entweder einer oder allen 3 betroffenen Zelllinien im Knochenmark oder peripherem Blut - >15% Ringsideroblasten der kernhaltigen erythrozytären Vorstufen 	Typische klinische Parameter - z.B. transfusionsbedürftige makrozytäre Anämie
Ausschluss aller Erkrankungen, die Zytopenien und/oder Dysplasien verursachen können	5-19% Blasten im KM oder peripheren Blut	Abnormer Phänotyp der KM (Durchflusszytometrie) klonale Zellpopulation
	MDS charakteristische Karyotyp /Chromosomenveränderung	Molekulargenetische typische Mutationen
		Koloniebildung hämatopoetischer Progenitorzellen (CFU-Assay)

Tabelle 1 Minimale diagnostische Kriterien des MDS, Legende: Hb= Hämoglobin, KM=Knochenmark, MDS=myelodysplastische Syndrome, CFU=Colony forming unit. (13)

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Diagnose MDS auf der Grundlage der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen, vor allem der Laboruntersuchung inklusive Differentialblutbild, der Knochenmarkuntersuchung sowie der molekulargenetischen bzw. chromosomalen Diagnostik gestellt werden kann. (12) (13) Der Grund ist, dass die jeweiligen Veränderungen zwar typisch für ein MDS, aber nicht pathognomisch sind. (12) So können Ringsideroblasten auch bei alkoholkranken Patienten vorkommen, und dysplastische Zellen können beispielsweise auch durch einen Vitaminmangel (Vit. B12) ausgelöst werden. (4)

1.1.4.1 Chromosomenanalyse

Bei ca. 50% der Patienten mit MDS kommt es zu chromosomalen Veränderungen.

(4)

Am häufigsten finden sich diese in den Chromosomen 5, 7, 8, 20 sowie Y und können entweder eine numerische Chromosomenaberration (Trisomie 8, -Y) oder eine strukturelle Chromosomenaberration (del 5q, Verlust von 20q (-20q)) sein.

(7) (14)

1.1.4.2 Molekulare Charakteristika

Die Leukämogenese bezeichnet die Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle in eine Tumorzelle, die mit einer klonalen Proliferation einhergeht.(15) Sowohl chromosomale Aberrationen als auch Genmutationen haben einen großen Einfluss auf diese maligne Entartung. (15) In diesem Kontext unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Formen von Mutationen: Founding, Driving oder Bystanding Mutation. (15) Abbildung 1 veranschaulicht den Einfluss dieser Mutationsformen auf die Myelodysplastogenese.

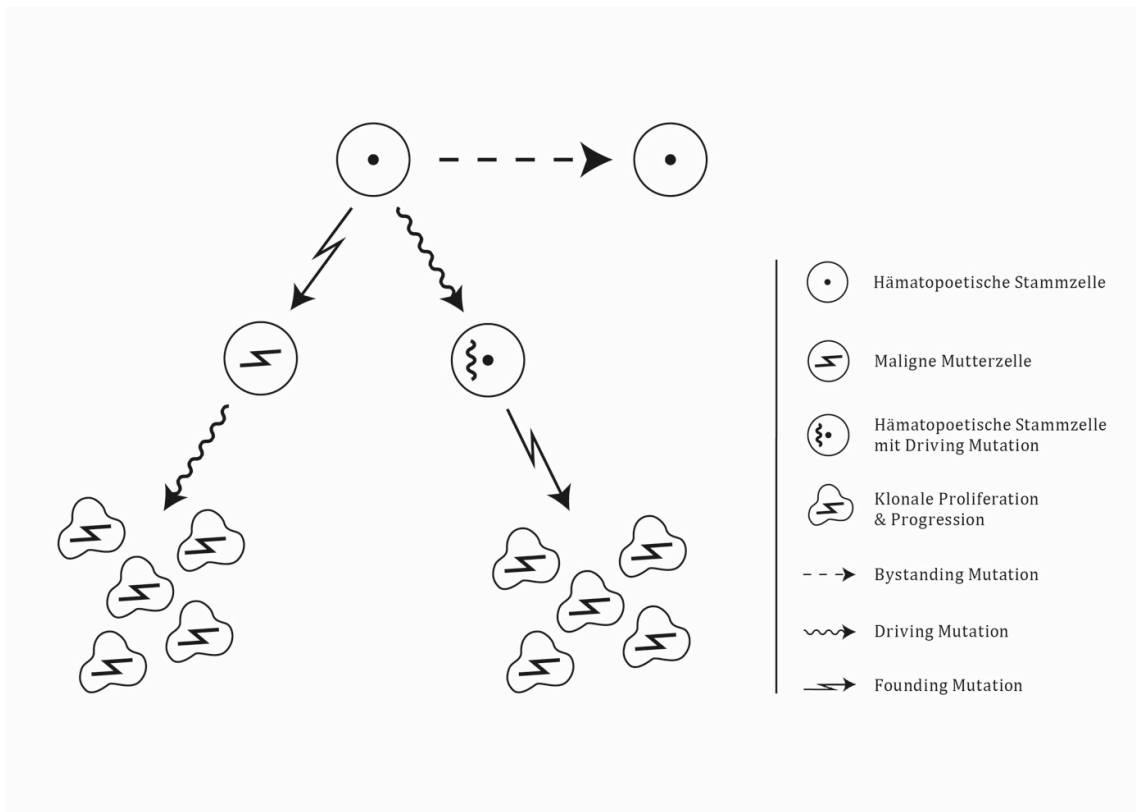


Abbildung 1 Mutationsformen bei Genen.

Eine Founding Mutation ist eine Mutation, die die Entartung auslöst. (15) Man könnte sie sozusagen als eine „Stammvater-Mutation“ bezeichnen. Die Driving Mutations sind die sogenannten Treiber-Mutationen. Treiber-Gene sind Gene, die den Progress der Leukämogenese und Myelodysplastogenese vorantreiben, ohne die maligne Transformation als solche selbst auslösen zu können. (16) (17)

Beispielsweise kann eine Driving Mutation zeitlich gesehen vor einer Founding Mutation vorkommen. Ohne das gleichzeitige Vorliegen einer Founding Mutation würde diese Zelle allerdings nicht in eine maligne Form entarten. (15) Sollte allerdings eine Founding Mutation ausgelöst werden, kann der Progress der Entartung durch das Vorhandensein der Driving Mutation beschleunigt werden. Es finden sich bei 75% der MDS-Patienten mindestens eine Driving Mutation. (17)

Eine Bystanding Mutation ist eine Mutation, die sich in einer entarteten Zelle findet und deren Bedeutung bislang noch nicht bekannt ist.

In der Regel benötigen die Myelodysplastogenese und Leukämogenese allerdings viele verschiedene Gene, die sich in ihrer Wirkung addieren. (7) Spannenderweise gibt es unzählige Kombinationsmöglichkeiten, da viele Mutagene Einfluss auf

mehrere Entwicklungspunkte der Entartung haben können. Der Wirkungsgrad einzelner Mutationen auf die Transformation ist dabei unterschiedlich. (7) Die Aufstellung einer möglichst genauen molekulargenetische Karte von MDS-typischen Mutationen ist deshalb, gerade im Hinblick auf die Prognose und das Therapieansprechen, sehr sinnvoll. (7)

Es wird vermutet, dass die MDS-Myelodysplastogenese vor allem durch altersbedingte Veränderungen im Sinne von mutierten Genen ausgelöst wird. (4) Man unterscheidet dabei drei verschiedene Angriffspunkte: Es können Gene betroffen sein, die die Epigenetik der Zelle verändern, Gene des RNA-Splicing-Apparates oder diejenigen, die die DNA-Reparaturmechanismen codieren. (4) Auch eine altersbedingte Verkürzung der Telomere ist bei der Entstehung der MDS mitbeteiligt. (17)

TET2, das für Tet Methylcytosin Dioxygenase 2 steht, ist mit einem Anteil von 26% (14) das am häufigsten mutierte Gen bei MDS und codiert für eine α -Ketoglutarat (α -KG) abhängige Dioxygenase. (7) Dioxygenasen fungieren als epigenetische Regulatoren, indem sie die Methylierung der DNA verändern. (7) Eine erhöhte Methylierung der DNA führt zur Inaktivierung des betroffenen DNA-Abschnittes. Interessanterweise finden sich mutierte TET2-Gene auch bei myeloproliferativen Neoplasien. Dies deutet darauf hin, dass diese Mutation nicht für die MDS-typischen Dysplasien verantwortlich zu machen ist. (7) Man vermutet vielmehr, dass TET2 eine Driving Mutation ist, da sie die klonale Dominanz der Ursprungszelle sowohl auslösen als auch verstärken können. (7) Allerdings gibt es bislang keine Studien, die einen eindeutigen Einfluss einer TET2-Mutation auf die Prognose darlegen. (7) Die mutagene Wirkung von TET2 wird durch das Loss-of-Function-Prinzip erklärt. (14) Interessanterweise finden sich Mutationen von TET2 zu einem hohen Prozentsatz auch bei der CMML. (18) Bei einer CMML ist eine TET2-Mutation allerdings nicht das am häufigsten mutierte Gen. (18)

Bei circa 10% der Patienten mit MDS finden sich Mutationen des Additional sex-comb like 1 (ASXL1), welches die Genexpression auf der epigenetischen Ebene beeinflusst. (7) Die von ASXL1 codierten chromatinbindenden Proteine fungieren als ligandenabhängige Koaktivatoren des Retinsäurerezeptors. (7) Die epigenetische Wirkung entsteht durch eine Interaktion, entweder mit Histon-

Acyltransferasen oder Histon-Demethylasen. (7) Häufig findet sich eine ASXL-1-Mutation ohne weitere MDS-typische Veränderungen. Allerdings finden sich teilweise mutierte ASXL-1 neben mutierten RUNX-1 oder TET-2. (7) Der Einfluss einer ASXL-1-Mutation auf die Prognose und Progression der MDS ist bislang noch unbekannt. (7)

Das zweithäufigste mutierte Gen bei MDS ist Runt-related transcription factor 1 (RUNX1). (7) Es gehört in die Genfamilie der Transkriptions-Core-binding-Faktoren. (7). Die Häufigkeit variiert zwischen 7-15% bei primären MDS. (7) Interessanterweise findet sich diese Mutation bei sekundärem therapieinduzierten MDS häufiger als bei einer primären Form. Es ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (7) In Tierversuchen mit Mäusen wurde gezeigt, dass die mutagene Wirkung durch eine Gain-of-Function, die einen Einfluss auf die Runt-Domäne des Gens hat, ausgelöst wird. (7)

Mutationen, die den Signalweg einer Zelle betreffen, können bei den MDS auch vorkommen. (7) Typischerweise sind es aktivierende Mutationen der RAS-Gene. (7) NRAS-Mutationen finden sich in circa 10-15% und KRAS-Mutationen in circa 2%. (7) Beide Mutationen gehen mit einer schlechteren Prognose einher. (7)

Mutationen des Gens SRFS2 (Serine/Arginine-rich splicing factor 2) sind im Gegensatz zur CMML bei MDS mit einer Häufigkeit von 5-10% selten. (18) Das Gen ist Teil des Spleisosomapparates einer Zelle und bei MDS mit einem verkürzten Overall Survival sowie einem verkürzten Leukemia-Free-Survival assoziiert. (18)

SETBP1 (SET binding protein 1) ist ein Gen, das an der DNA-Transkription beteiligt ist. (15) Bei MDS ist es mit einem Progress der Erkrankung assoziiert. (15)

Genetische Veränderungen finden sich häufiger bei sekundären MDS als bei primären MDS. (14)

Zusammengefasst zeigt sich, dass alle Angriffspunkte von mutierten Genen zu einer MDS-auslösenden Zelle führen, die eine erhöhte Fähigkeit zur Selbsterneuerung hat. (7) Entweder durch eine verminderte Apoptose und/oder eine verstärkte Proliferation entsteht aus dieser einzelnen mutierten Zelle eine klonale Zellkolonie. (7) Abhängig davon, welche Mutagene diese Entwicklung auslösen und fördern, variiert das klinische Bild der MDS. Dies bedeutet, dass das

Ausmaß der Zytopenien und die Aggressivität der Erkrankung mit bestimmten Mutationen korrelieren können. (7) Damit ist es für die Prognoseabschätzung eines Patienten essentiell, mögliche Mutationen herauszufinden. Die Ähnlichkeit der Erkrankungen MDS und CMML zeigt sich in ihren molekularen Charakteristika (vgl. TET2-Mutationen).

1.1.5 MDS-Subtypen

Die Unterteilung der Myelodysplastischen Syndrome in verschiedene Subtypen wurde im Laufe der letzten 30 Jahre mehrfach überarbeitet. (4)

In der ersten Klassifikation von 1982, basierend auf den morphologischen Kriterien des FAB-Klassifikationssystems, konnten zunächst 5 Subtypen unterschieden werden. Diese Unterteilung erfolgte auf Grundlage des Ringsidero- und Blastengehalts sowie des Schweregrads der Monozytose. Die ursprünglichen fünf MDS-Subtypen waren die Refraktäre Anämie (RA), Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), Chronisch myelomonozytäre Leukämie (CMML), Refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB) und Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-T). (4) Die 5 Subtypen wurden wiederum in Low-Grade-Formen der MDS eingeteilt mit einem längeren medianen Overall Survival und High-Grade-Formen. Die beiden Low-Grade-Formen waren RA und RARS. (4)

Knapp 20 Jahre später, 2001, wurde eine Klassifikation durch die WHO vorgeschlagen, in welcher die CMML in den myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasienkomplex hinzugefügt wurde. (4) Dies lag an der myeloproliferativen Komponente der CMML, obgleich die CMML aufgrund ihrer myelodysplastischen Ausprägung mit den Erkrankungen der MDS eng verwandt ist. (4)

Im Jahr 2016 wurde eine überarbeitete Version der MDS-Subtypeinteilung vorgestellt. (5) In ihr wurden die Morphologiekriterien, das Ausmaß und der Einfluss der Zytopenien sowie der Einfluss genetischer Veränderungen auf die Prognose und den Subtyp aufgearbeitet. (5) Folglich werden die Subtypen nach dem Klassifikationssystem von 2016 als „MDS“ bezeichnet und Subtypen, die eine

bestimmte Zytopenie (z.B. RA) benennen, wurden aus dem System gestrichen. (5) Spezifische Merkmale eines Subtypen werden an die „MDS“-Abkürzung angehängt, womit auch eine mögliche Dysplasie beschrieben werden kann. (5) Ebenso wurden die Diagnosekriterien für die unklassifizierbare MDS (MDS-U) verändert. So kann jetzt die Diagnose MDS-U erst gestellt werden, wenn <1% Blasten im peripheren Blut und <5% Blasten im Knochenmark an zwei unabhängigen Zeitpunkten aufzufinden sind. (5) Tabelle 3 zeigt die neue MDS-Klassifikation. (5)

	Dysplastische Zelllinien	Zelllinien mit Zytopenien	Ringsideroblasten in %	Blasten im PB in %	Blasten im KM in %
MDS-SLD	1	1-2	<15	<1,	<5
MDS-MLD	2-3	1-3	<15	<1,	<5
MDS-RS	1	1-2	>15	<1	<5
- SLD	2-3	1-3	>15	<1	<5
- -MLD					
MDS (del)5q	1-3	1-2	</> 15	<1	<5
MDS-EB	0-3	1-3	</> 15	2 – 4	5 – 9
- EB-1	0-3	1-3	</> 15	5 – 19	10 – 19
- EB-2					
MDS-U	1-3	1-3	</> 15	1	<5

Tabelle 2 MDS-Subtypen nach WHO 2016, Legende: MDS=Myelodysplastische Syndrome, SLD=Single Lineage dysplasia, MLD=Multilineage Dysplasia, RS=Ringsideroblasten, EB=Blastenexzess, U=Unklassifizierbar, PB=Peripheres Blut, KM=Knochenmark.

Die MDS-Subtypen in der 2016 überarbeiteten Version werden weiter in eine Niedrigrisiko- (low risk) und Hochrisiko- (high risk) Gruppe unterteilt. (19) Diese Unterteilung erfolgt anhand des Blastenanteils im Knochenmark, wobei ein Blastenanteil von 5% der Schnittpunkt zwischen den Niedrigrisiko- und Hochrisikoformen bedeutet. (19)

Knapp 25% der Patienten mit MDS haben eine leichte Monozytose, ohne jedoch die Kriterien einer CMML zu erfüllen. (20)

1.1.6 Verlauf

Der Krankheitsverlauf bei MDS ist äußerst vielfältig. Einfluss auf den Verlauf haben der Anteil der Blasten im Knochenmark, Chromosomenaberrationen und die hämatopoetische Insuffizienz, die sich durch einen erhöhten Transfusionsbedarf (Erythrozyten sowie Thrombozyten) und eine erhöhte Infektanfälligkeit äußert. (12)

Gleichzeitig beeinflussen auch das Alter, mögliche Komorbiditäten sowie das Geschlecht die Prognose. (12) Aus diesem Grund wurden verschiedene Prognosesysteme entwickelt, um einem Patienten eine möglichst individuelle Prognoseevaluation bieten zu können. (12) Diese Scoring Systeme unterteilen die MDS-Patienten in Niedrig- und Hochrisikopatienten. Bei ersteren kann ein „Watchful Waiting“ ausreichend, bei letzteren eine Therapieeskalation bis hin zu einer Stammzelltransplantation vonnöten sein. (12)

Eines dieser Systeme ist das „Internationale prognostic scoring system“ (kurz IPSS), das den Anteil von Blasten im Knochenmark, das Ausmaß der Zytopenien sowie die betroffenen Zelllinien und Chromosomenaberrationen als Prognosefaktoren verwendet. Hierbei können die Patienten in die Gruppen „Niedrigrisiko“ (low risk), „intermediär 1 und 2“ (intermediate risk 1 / 2) und „Hochrisiko“ (high risk) eingeteilt werden. (2) Das mediane Überleben rangiert von 5,7 Jahren (low risk) bis zu wenigen Monaten (4,8 Monate, high risk). (2) In den Niedrigrisiko- und den beiden intermediären Risikogruppen sterben 50% der Patienten nicht an ihrer MDS-Erkrankung, sondern an anderen Komorbiditäten. (21) Der Nachteil des IPSS ist, dass genetische Veränderungen bislang nicht beachtet werden. Im Jahr 2013 wurde das IPSS überarbeitet. Die überarbeitete Version des IPSS wird IPSS-R (R für retrospektiv) genannt und sublimiert die verwendeten Prognosefaktoren. Beispielsweise werden nun fünf statt drei Risikogruppen für Chromosomenaberrationen unterschieden. (12)

1.1.6.1 Progress in eine AML

Im Verlauf kommt es bei circa 30% der Patienten mit MDS zu einem Progress in eine sekundäre AML. (14)

Ein Risikofaktor für eine Progression ist der Blastenanteil im Knochenmark. So entwickeln 25% der Patienten mit RAEB-I im Verlauf eine AML, während es bei Patienten mit RAEB-II bereits 33% sind. (2)

Weitere Risikofaktoren sind zytogenetische Veränderungen und die Anzahl der von der Dysplasie betroffenen Zelllinien. (21)

1.2 **CMML**

Die chronische myelomonozytäre Leukämie wird laut der WHO der Kategorie „myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien“ (kurz MDS/MPN) zugerechnet. (2, 3) Dies bedeutet, dass die CMML zu den Knochenmarkserkrankungen gehört, bei denen sowohl Merkmale einer myelodysplastischen als auch einer myeloproliferativen Erkrankung zu finden sind. (3) Diese erwähnten Merkmale beziehen sich auf die Laborwerte und die Morphologie der Erkrankung. (3)

1.2.1 **Ätiologie**

Man unterscheidet eine De-novo- und eine sekundäre Form der CMML. (22) Die sekundäre Form der CMML kann, genau wie das MDS, therapieinduziert sein. (22) Hierbei gelten vor allem eine vorangegangene Radio- und/oder Chemotherapie als Risikofaktoren. (22) Eine sekundäre CMML kann sich auch aus einer MDS entwickeln. (23)

1.2.2 Epidemiologie

Die CMML ist eine seltene Knochenmarkserkrankung. Die Inzidenz wird auf <1/100.000 Personen im Jahr geschätzt. (3) In Amerika liegt die altersadaptierte Inzidenz bei 0,3/100.000 Einwohner pro Jahr. (23) Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die reale Inzidenz aufgrund Fehlklassifikationen oder Fehldiagnosen höher liegt. (23) Genau wie das MDS ist sie eine Erkrankung des älteren Menschen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei circa 70 Jahren. (3) Die therapieinduzierte Form der CMML ist mit einem Anteil von 11% aller CMML-Formen selten. (23)

1.2.3 Klinik

Ähnlich wie bei den MDS kann die Klinik eines Patienten mit einer CMML durch die Knochenmarksinsuffizienz verursacht werden. (3) Allerdings finden sich bei CMML-Patienten im Gegensatz zu den Patienten mit MDS auch Hepato- /und Splenomegalien sowie extramedulläre leukämische Infiltrationen der Haut und Lymphknoten. (3) (11) Das klinische Bild kann in Ausprägung der Symptome, der Aggressivität der Erkrankung sowie des AML-Progressrisikos frappierend variieren. (24) Eine typische CMML Klinik geht mit der sogenannten B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) sowie einem Schwächegefühl einher. (11) Blutungen, ausgelöst durch Thrombozytopenien, sind recht selten. (11)

1.2.4 Diagnostik

Die Morphologie der CMML kann anderen neoplastischen und/oder dysplastischen Knochenmarkserkrankungen sehr stark ähneln. (5) Aus diesem Grund darf die Diagnose CMML erst gestellt werden, wenn für andere Erkrankungen typische

molekulargenetische Veränderungen und Chromosomenaberrationen ausgeschlossen wurden. (5) Beispielsweise muss die Abwesenheit des Philadelphia-Chromosoms (BCR-ABL1-Fusionsgen) zum Ausschluss einer CML nachgewiesen werden. (5)

Charakteristisch für die CMML ist die persistierende (> 3 Monate) absolute und relative Monozytose. (25) Man spricht von einer absoluten und relativen Monozytose, sobald im peripheren Blut >1000 Monozyten/ μ l vorkommen, die \geq 10% der Leukozyten ausmachen. Dies bedeutet, dass die Diagnose CMML erst gestellt werden kann, wenn die eben erwähnten Kriterien erfüllt sind. Allerdings haben knapp 25% der Patienten mit MDS eine leichte Monozytose, die diese Kriterien nicht erfüllt. (20) Ob diese Patienten von ihrem klinischen Verlauf den MDS-Patienten ohne leichte Monozytose ähneln oder den CMML-Patienten, ist bislang nicht bekannt.

1.2.4.1 Chromosomenanalyse

Insgesamt kommen chromosomale Aberrationen bei ungefähr 30% der CMML-Fälle vor. (18) Häufig finden sich Aberrationen der Chromosome Y, 8, 7, 21 oder auch komplexe Chromosomenaberrationen. (18) Im Gegensatz zu den MDS finden sich Monosomien oder auch das MDS-typische, isolierte (del)5q-Syndrom bei der CMML selten. (18)

Das spanische zytogenetische Risiko-Stratifikationssystem teilt Patienten aufgrund ihres Karyotyps in drei unterschiedliche Risikogruppen ein. (18) Man unterscheidet in diesem System niedriges, intermediäres und hohes Risiko. (18) Das Spanische zytogenetische Risiko-Stratifikationssystem ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Low Risk	Intermediate Risk	High Risk
- Normaler Karyotyp	- alle übrigen Karyotypen	- Trisomie 8 - Aberrationen von

- -Y		Chromosom 7 - Komplexer Karyotyp (>3 Veränderungen)
------	--	-----------------------------------------------------------

Tabelle 3 Spanisches zytogenetisches Risiko-Stratifikationssystem. (18)

1.2.4.2 Molekulare Charakteristika

Mehr als 90% der Patienten mit CMML haben genetische Veränderungen. (18) In Tabelle 4 werden die möglichen Mutationen kategorisiert. (18)

Mutationskategorie	Betroffene Gene (Beispiele)
Epigenetische Veränderungen	TET2
Veränderungen der Chromationregulation und Histonmodifikation	ASXL1
Veränderungen des Splicingapparats	SRF2
Veränderungen des Cohesin-Komplexes	STAG2
Veränderungen der DNA-Reparaturmaschinerie	TP53
Veränderungen der Signaltransduktion und des Rezeptor-Tyrosinkinase-Weges	JAK2, NRAS, CBL
Andere	RUNX1, SETBP1

Tabelle 4 Mutationskategorien bei der CMML, Legende: TET2=Tet methylcytosin dioxygenase 2, ASXL1= Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1, SRF2= serum response factor 2, STAG2= Stromal antigen 2, TP53=Tumor protein 53, JAK2= Janus kinase 2, NRAS= Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, CBL= Casitas B-lineage lymphoma, RUNX1= Runt related transcription factor 1, SETBP1= SET binding protein 1. (18)

Obwohl die möglichen Wege der Leukämogenese der CMML sehr vielfältig sind, deuten aktuelle Studienergebnisse darauf hin, dass es zuerst zu epigenetischen Veränderungen kommt. (18) Darauf folgen Veränderungen des Splicingapparats

und der Transkriptionsfaktoren. Veränderungen des Signalweges einer Zelle, der zur Proliferation des malignen Zellklons führt, stehen zeitlich gesehen an letzter Stelle der CMML-Leukämogenese. (18)

Im Vergleich zu den übrigen hämatologischen Neoplasien finden sich bei der CMML Mutationen des RAS-Signalweges am häufigsten. (25) Die Häufigkeit beträgt circa 50%. (25). Die betroffenen Codons von NRAS oder KRAS sind 61, 13 und 12. (25) Klinisch führen Mutationen dieses Signalweges zu einer ausgeprägteren Monozytose und einem verkürzten Überleben. (25) Ebenso kommen sie bei der proliferativen Subform der CMML häufiger vor als bei dem dysplastischen Subtyp, welches durch den Einfluss der Gene auf die Zellproliferation verursacht wird. (25) Tiermodelle lassen darauf schließen, dass eine Mutation im RAS-Signalweg einen elementaren Einfluss auf die Myeloproliferation bei CMML hat. (23)

TET2-Mutationen kommen wie auch bei den MDS sehr häufig (ca. 60%) bei Patienten mit einer CMML vor. (18) Allerdings hat diese Mutation keinen unabhängigen Einfluss auf das Overall Survival. (18) Gleichzeitig verbessert eine TET2-Mutation das Overall Survival, wenn nicht gleichzeitig eine ASXL1-Mutation vorliegt. (18)

Bei 40% der Patienten mit einer CMML finden sich ASXL1-Mutationen. (18) Dies ist insofern interessant, da der Phänotyp dieser Patienten mit einer deutlichen Leukozytose, einer deutlichen absoluten Monozytose sowie dem Vorhandensein unreifer myeloischer Zellen im peripheren Blut einhergeht. (18) Sowohl Nonsense- als auch Frameshift-Mutationen des ASXL1 Gens beeinflussen die Überlebenszeit negativ. (18)

Das RUNX1-Gen codiert für einen DNA-bindenden Teil eines Transkriptionsfaktors (der sogenannte Core binding factor), womit es eine essentielle Rolle im Ablauf der normalen Hämatopoese und Differenzierung der Knochenmarkszellen spielt. (18) Mutationen dieses Gens kommen bei circa 15% der CMML-Fälle vor und können mit einem raschem AML-Progress verknüpft sein. (18)

Das Gen SETBP-1 (SET binding protein 1) codiert für ein Protein, das Teil des Apoptose- und Transkriptionsapparats einer Zelle ist. (18) Die Häufigkeit bei CMML beträgt 5-10%. (18) In-vitro-Versuche deuten darauf hin, dass diese Mutation zu einer verstärkten Proliferation führt. (18)

SRFS2 (Serin/Arginin rich splicing factor 2) gehört zu den Genen, die für die Proteine des Splicingapparats codieren. (18) Diese Gene erkennen veränderte, abnormale Abschnitte und Bereiche im 3'-Ende der pre-mRNA. Während SRFS2-Mutationen bei den MDS mit einer Häufigkeit von 20% zu finden sind und mit einer verkürzten Overall Survival einhergehen, findet sich diese Mutation bei der CMML deutlich häufiger. Bei der CMML liegt die Häufigkeit bei circa 50%. (18) Das Gen hat drei Mutationshotspots, und interessanterweise finden sich 50% der Mutationen in einem Hotspot (K700E). (18) Der Phänotyp einer SRFS2-Mutation bei CMML ist ein höheres Patientenalter und eine mäßige bis geringe Anämie. (18) Bislang gibt es keinen Nachweis, dass SRFS2 einen unabhängigen Einfluss auf das Overall Survival der Patienten hat. (18)

Mutationen, die den DNA-Reperatur-Mechanismus betreffen, finden sich zwar bei Patienten mit einer CMML, allerdings sind sie sehr selten. (18)

Insgesamt ist die Pathophysiologie der CMML nur unzureichend bekannt. (23)

1.2.5 CMML-Subtypen

Die CMML gehört zu den Erkrankungen, bei denen sowohl dysplastische (CMML-MD) als auch proliferative (CMML-MP) Merkmale zu finden sind. (5) Eine proliferative Unterform der CMML zeichnet sich durch eine Leukozytose (WBC count > $(13 \cdot 10^9)/L$) aus und die dysplastische Form durch eine Leukopenie (WBC count < $(13 \cdot 10^9)/L$). (5) Diese beiden Formen werden vor allem durch unterschiedliche Veränderungen im RAS/MAPK-Signalweg ausgelöst. (5) Ein weiteres Merkmal dieser Subtypen ist ihre Prognose. (25) Die CMML-MP ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (25)

Seit 2016 gibt es eine überarbeitete Version der Subtypen. (26) Hierbei werden die überwiegend dysplastischen und überwiegend proliferativen Formen berücksichtigt, und die CMML wurde unter Zuhilfenahme der Blasten im Knochenmark in drei statt zwei Subtypen unterteilt. (26) (27)

Tabelle 5 zeigt die überarbeitete Version der Subtypen auf.

	Subtyp 0		Subtyp 1		Subtyp 2	
Blastenanteil im KM, in Prozent angegeben	<5		5-9		10-19	
Proliferative bzw. dysplastische Unterform, WBC	>(13*10 ⁹)/L	<(13*10 ⁹)/L	>(13*10 ⁹)/L	<(13*10 ⁹)/L	>(13*10 ⁹)/L	<(13*10 ⁹)/L

Tabelle 5 CMML-Subtypen nach der überarbeiteten Version von 2016, Legende: KM=Knochenmark, WBC=White Blood Cells.(27)

Der Grund für die Unterteilung der CMML-Subtypen anhand des Blastenanteils im Knochenmark ist, dass der Blastenanteil Einfluss auf die Prognose der Erkrankung hat. (5) Ein hoher Blastenanteil geht mit einer eher schlechteren Prognose einher.

1.2.6 Verlauf

Die Klinik der CMML und damit auch der Verlauf ist wie bei den MDS sehr variabel, weshalb ein Prognosesystem sinnvoll ist. (28) Bis 2016 gab es allerdings kein allgemein anerkanntes Prognosesystem. (28) In diesem Jahr wurde von einer spanisch-italienisch-deutschen Arbeitsgruppe ein CMML-spezifisches Prognosesystem, das sogenannte CMML-specific prognostic scoring system (kurz CPSS), entwickelt. (28)

Wie der IPSS teilt auch das CPSS die CMML-Patienten in vier Risikogruppen auf: Niedrigrisiko- (low risk), intermediäres Risiko I und II (intermediate risk I/II) und eine Hochrisiko-Gruppe (high risk). (28) Innerhalb dieser Risikogruppen variierte das mediane Overall Survival der Patienten. Beispielsweise lag das mediane Gesamtüberleben von Patienten der Niedrigrisikogruppe bei 72 Monaten, während es bei Patienten der Hochrisikogruppe fünf Monate betrug. (28)

Der CPSS berücksichtigt als Prognosefaktoren den CMML-FAB-Subtyp, den CMML-WHO-Subtyp, den Erythrozytentransfusionsbedarf, den LDH-Spiegel sowie die CMML-spezifischen zytogenetischen Risikokategorien. (28)

1.2.6.1 Progress in eine AML

Die Morphologie und Klinik der CMML ist sehr vielfältig, sodass es verschiedene Risikofaktoren für den Progress in eine AML gibt. (28) Eine spanisch-italienisch-deutsche Arbeitsgruppe benennt vier solcher Risikofaktoren: CMML-FAB-Subtyp, CMML-WHO-Subtyp, CMML-spezifischen, zytogenetische Risikokategorien und Transfusionsabhängigkeit. (28)

Das Risiko, im Verlauf eine Transformation in eine AML zu entwickeln, beträgt für Patienten mit CMML circa 30%. (18) Je nach CPSS-Risikogruppe verändert sich dieses Progressrisiko. (28) In der Niedrigrisikogruppe beträgt die Transformationsrate innerhalb der ersten fünf Jahre 13% und in der Hochrisikogruppe 73%. (28)

2 Zielsetzung/Fragestellung

Im Rahmen dieser Promotion wurde der Monozytenverlauf von MDS-Patienten mit leichter Monozytose und einer Monozytenpopulation im Knochenmark zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt in Hinblick auf einen möglichen Progress in eine CMML untersucht. Diese Patienten erfüllten zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt (noch) nicht die Diagnosekriterien einer CMML. Weiterhin wurden der Krankheitsverlauf und die molekularen Charakteristika der MDS-Patienten mit leichter Monozytose sowie Monozytenpopulation im Knochenmark mit MDS-Patienten ohne diese beiden Merkmale verglichen. Das Ziel war, eine eventuelle Ähnlichkeit der Erkrankungsarten auch im Hinblick auf das Überleben in Erfahrung zu bringen.

Es wurden folgende Parameter betrachtet:

- Monozytenverlauf im peripheren Blut
- Molekulare Charakteristika: Hierbei wurde das Knochenmark der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose MDS untersucht, um herauszufinden, ob mögliche CMML-typische Mutationen bereits bei der MDS-Erstdiagnose vorlagen
- Die Klinik der Patienten im Hinblick auf eine mögliche B-Symptomatik (Anämiezeichen, Infektanfälligkeit, Fieber, Nachtschweiß) sowie typische Charakteristika einer CMML (Hepato- und/oder Splenomagalie, vergrößerte Lymphknoten)
- Progressraten in eine CMML, sekundäre AML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp

Für Patienten mit einer Monozytenpopulation im Knochenmark und einer leichten Monozytose zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt wird im folgenden die Bezeichnung „Patienten mit Monozytenpopulation“ verwendet und für Patienten ohne diese Charakteristika „Patienten ohne Monozytenpopulation“.

3 Methoden

3.1 Ethikvotum

Die vorliegende Arbeit ist durch das Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 3008 (01/2008) und durch das Ethikvotum mit dem Aktenzeichen 3768 (07/2013) abgedeckt.

3.2 Patienten

Im Jahr 1982 wurde das Düsseldorfer MDS-Register etabliert. In diesem Register werden die Daten von MDS-Patienten, die an der Düsseldorfer Universitätsklinik diagnostiziert wurden, erfasst. Mittlerweile umfasst es ca. 6500 Patienten. Zu den eingespeicherten Daten gehören das Erkrankungsalter, Komorbiditäten, der MDS-Subtyp, Zytologie und Histologie sowie mögliche Veränderungen und Progresse bei Follow-up-Untersuchungen. Das Register dient somit als Datenquelle für Longitudinalstudien und Verlaufsbeobachtungen. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf die Patientendaten zurückgegriffen.

3.3 Datenrecherche

Zu Beginn der Arbeit wurden geeignete Parameter bestimmt, um die für die Fragestellung geeigneten Daten von Patienten finden zu können. Die ausgewählten Variablen waren absolute Monozytenzahl, relative Monozytenzahl und Esterasefärbung des Knochenmarks sowie eine Knochenmarksmorphologie, durchgeführt im Labor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinische Immunologie. Patienten, bei denen eine der Variablen nicht bestimmt bzw. nicht zu ermitteln war, wurden nicht mitaufgenommen.

Patienten mit Monozytenpopulation, bei denen die absolute Monozytenzahl unter 100/ μ l lag, wurden manuell aussortiert. Somit verkleinerte sich das ursprünglich ausgewählte Patientenkollektiv von ca. 3500 Patienten auf 1821 Patienten.

Als Vergleichsgruppe wurden Patienten ausgewählt, die keine Monozytenpopulation im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose und keine leichte Monozytose im peripheren Blut hatten. Diese Patienten hatten eine negative Esterasefärbung, und es konnte keine Monozytenpopulation in der Knochenmarksmorphologie bestimmt werden.

Weitere 315 Patienten wurden in einem getrennt von der ersten Auswahl ablaufenden Arbeitsschritt durch eine Verfeinerung der Parameter ausgewählt, um eine mögliche Eingrenzung zukünftiger Ergebnisse zu erreichen. Auswahlkriterien für die zu evaluierenden Patienten waren absolute Monozytenzahl im peripheren Blut zwischen 100-900/ μ l und entweder über 10% Monozytenproliferation im Knochenmark oder ein positives Ergebnis der Esterasefärbung des Knochenmarks. Dies traf auf 183 der 315 Patienten zu. Die Kriterien der Kontrollgruppe (132 von 315 Patienten) waren absolute Monozytenzahl im peripheren Blut <100/ μ l und entweder unter 10% Monozytenproliferation im Knochenmark oder ein negatives Ergebnis der Esterasefärbung.

Zusätzliche Ausschlusskriterien waren eine hereditäre Ursache der Erkrankung, eine CMML als Erstdiagnose oder eine nach dem Zeitpunkt der MDS-Diagnose aufgetretene zweite hämatologische Grunderkrankung, z.B. ein Non-Hodgkin-Lymphom. Traten vor der MDS-Diagnose bereits nicht-hämatologische Tumorerkrankungen oder hämatologische Tumorerkrankungen auf, war dies kein Ausschlusskriterium. Somit wurden in diese Arbeit auch sekundäre MDS-Formen mit eingeschlossen.

Die Monozytenverläufe, die Todesursache, die Klinik (B-Symptomatik, Hepatosplenomegalie und vergrößerte Lymphknoten) sowie mögliche Progression in eine sekundäre AML und/oder eine CMML der Patienten wurden in den analogen und den digitalen Akten gesucht und in eine eigens hierfür konzipierte Excel-Tabelle übertragen.

3.4 Verlauf

Bis auf die Daten im elektronischen Register fanden sich von insgesamt 1821 Patienten, deren Aktuell manuell bearbeitet worden waren, bei 231 Patienten keine weiteren Monozytendaten. Bei Überprüfung der Akten wurden weitere zwei Patienten mit einer CMML als Erstdiagnose aus dem zu untersuchenden Patientenkollektiv aussortiert. Sechs Patienten mit einer hereditären hämatologischen Erkrankung und 13 Patienten mit einer malignen hämatologischen Zweiterkrankung nach der MDS-Diagnose wurden ebenfalls ausgeschlossen. Insgesamt umfasste das Patientenkollektiv nach erneuter Überprüfung der Ausschlusskriterien noch 1807 Patienten.

Teilweise waren die im Register gefundenen Patientendaten aufgrund des „lost to follow-up“ unvollständig. Bei diesen Patienten und bei jenen, deren Status „lebend“ vor dem Jahr 2015 dokumentiert worden war, wurden die Hausärzte bzw. die niedergelassenen Hämatologen/Onkologen kontaktiert, um aktuelle Informationen zu gewinnen.

3.5 Molekulargenetische Untersuchung

Eine stichprobenartige molekulargenetische Untersuchung erfolgte sowohl in der größeren Untersuchungskohorte (inklusive Vergleichsgruppe) als auch in der kleineren Untersuchungskohorte (inklusive Vergleichsgruppe), die durch eine Verfeinerung der Auswahlparameter eingegrenzt wurde.

Aus der Biobank des MDS-Registers wurde von 80 Patienten eine ausreichende DNA-Menge im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose entnommen.

Eine molekulargenetische Untersuchung wurde bei 20 Patienten mit Monozytenpopulation durchgeführt. Diese 20 Patienten wurden als Zufallsstichprobe ausgewählt. Zielgene waren ASXL1, RUNX1, NRAS, SETBP1, SRFS2 und TET2. Diese sind typisch für eine CMML.

Eine molekulargenetische Untersuchung wurde ebenfalls bei 20 Patienten der Vergleichskohorte (Patienten ohne leichte Monozytose und ohne

Monozytenpopulation im Knochenmark zum MD-Erstdiagnosezeitpunkt) durchgeführt, um die DNA auf CMML-typische Mutationen hin zu untersuchen. Diese 20 Patienten wurden auch zufällig ausgewählt.

Zusätzlich erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung oben erwähnter Gene bei jeweils 20 Patienten sowohl der Untersuchungs- als auch der Kontrollgruppe, die zufällig aus dem durch engmaschigere Parameter verkleinerten zweiten Patientenkollektiv ausgewählt wurden.

Für die molekulargenetische Untersuchung wurde das Myeloid Panel der Firma Illumina verwendet.

3.6 Statistik

Das Patientenkollektiv mit einer vorhandenen Monozytenpopulation im Knochenmark und leichter Monozytose zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose wurde mit einem entsprechenden Kollektiv ohne Monozytenpopulation im Knochenmark (zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose) und ohne Monozytose verglichen. Ziel war, die möglichen unterschiedlichen CMML-Progressraten zwischen den Patienten mit und ohne Monozytenpopulation im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose zu berechnen. Hierfür wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 23 verwendet.

Die Vierfelder-Tafel (Chi-Quadrat-Test) wurde zur Darstellung der Häufigkeit gewählt. Weitere statistische Untersuchungen umfassten die Kaplan-Meier-Methode, um die Überlebensdauer im Bezug auf mögliche Transformationen in höhergradige MDS-Formen, CMML oder eine AML zu berechnen, und t-Tests, um die Patientenkollektive auf signifikante Unterschiede hin zu vergleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Patientendaten der größeren Untersuchungsgruppe

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden 1807 Patienten mit einer Monozytenpopulation im Knochenmark und einer leichten Monozytose zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt und 2710 Patienten ohne diese beiden Merkmale im Hinblick auf ihre CMML-Transformationsraten miteinander verglichen. Dabei wurden klinische und epidemiologische Parameter, Progressraten, molekulargenetische Merkmale, das kumulative Überleben sowie das Progressverhalten als Vergleichsmerkmale ausgewählt.

Patienten mit einer Monozytenpopulation im Knochenmark und einer leichten Monozytose zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt werden im Folgenden als „Patienten mit Monozytenpopulation“ bezeichnet und Patienten ohne diese Charakteristika als „Patienten ohne Monozytenpopulation“.

4.1.1 Klinische und epidemiologische Parameter

In Tabelle 6 werden die epidemiologischen Parameter (Geschlecht, Alter), klinische Beschwerden sowie Laborwerte der Patientengruppen miteinander verglichen.

Parameter	Patienten mit Monozytenpopulation	Patienten ohne Monozytenpopulation (Kontrollgruppe)	p- Wert (zweiseitiger Chi-Quadrat nach Pearson oder einseitiger t-Test)
Geschlecht	♂ 983(54,8%) ; ♀ 810(45,2%)	♂ 1481(54,7%), ♀ 1226(45,3%)	0,716
Alter in Jahren	14 - 72 - 100	0 - 70 - 105	0,272
WHO-Subtyp (aufgelistet sind die häufigsten Subtypen)	RCMD = 42,8% RAEB-I = 12,7% RAEB-II = 12,1% RA = 9,1%	RCMD = 30,5% RAEB-II = 20,2% RAEB-I = 15,9%	0,0005
Fieber	13,1%	17,2%	<0,0005
Hepatomegalie	14,7%	18,3%	0,009
Splenomegalie	15%	13,7%	0,55
Sonstige Symptome	33,2%	24,2%	<0,0005
Anämiezeichen	66,2%	71,4%	0,001
LK-Schwellung	6,1%	5,7%	0,703
HD	12,1%	18,3%	0,009
Thromboembolische Ereignisse	7,1%	8,6%	0,842
Infektanfälligkeit	21,5%	28,6%	0,036
Hb in g/dl	2,2 - 9,4 - 17,5	2,6 - 9,2 - 16,7	0,162
Thr/μl	0 - 140 - 1692	1 - 107 - 1900	0,296
WBC/μl	4 - 4300 - 150010	0 - 3100 - 238400	0,003
Gra/μl	5,5 - 2200 - 87305	1 - 1428 - 228864	0,994
Mono/μl	0 - 309 - 5640	0 - 36 - 3180	<0,0005
LDH in U/l	18 - 198 - 8302	1 - 209 - 3310	0,921
KM-Blasten als % der kernhaltigen Zellen	0 - 3 - 60	0 - 5 - 39	<0,0005

Tabelle 6 Vergleich der klinischen und epidemiologischen Parameter der Patienten mit und ohne Monozytenpopulation, Legende: Die numerischen Werte zeigen die Range und der Median (fettgedruckt). Es wurden die prozentualen Anteile von Patienten mit klinischen Beschwerden dargestellt. RCMD=Refraktäre Zytopenie mit Multilinearer Dysplasie, RAEB-I/II= Refraktäre Anämie mit Blastenexzess Typ I/II, RA=Refraktäre Anämie, WBC= White blood cells, Hb=Hämoglobin, Thr=Thrombozyten, Gra=Granulozyten, Mono=Monozyten, LDH=Laktatdehydrogenase, KM=Knochenmark, LK=Lymphknoten, HD=Hämorrhagische Diathese, WHO=World Health Organisation.

Aufgeführt in der Tabelle sind jeweils der p-Wert der statistischen Untersuchungsmethode. Für die numerischen Werte wurde ein einseitiger t-Test und für die nicht-numerischen Werte ein Chi-Quadrat-Test ausgewählt. Ist der p-

Wert <5%, wird die Nullhypothese abgelehnt, die Vergleichsgruppen sind somit nicht identisch. Dies ist erwartungsgemäß speziell bei der Monozytenzahl, aber auch bei der Anzahl an Knochenmarksblasten imponierend.

Die Patientengruppen unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Geschlechterverteilung, ihrem Alter (Median und Intervallbereich) oder in den klinischen Beschwerden „Splénomegalie“, „Lymphknotenschwellung“, „Thromboembolische Ereignisse“ und auch nicht in ihren Laborwerten Hämoglobinlevel, Thrombozytenzahl, Granulozytenzahl und LDH-Werte.

Bei der Betrachtung der klinischen Beschwerden sticht ins Auge, dass die Patienten mit Monozytenpopulation seltener die „typische CMML-Klinik“ (Hepato- und/oder Splénomegalie und Lymphknotenvergrößerungen) zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose aufweisen als die Patienten ohne Monozytenpopulation.

4.1.2 Progress

Im Rahmen dieser Promotion wurden mögliche Transformationen in eine CMML, eine sekundäre AML und in andere höhergradige MDS-Subtypen untersucht.

4.1.2.1 Progress in eine CMML

Die Rate an Transformationen in eine CMML und einen höhergradigen MDS-Subtyp beider Patientenkollektive wird im Folgenden dargestellt.

4.1.2.1.1 Patienten mit Monozytenpopulation

Insgesamt fand sich bei 168 Patienten mit Monozytenpopulation ein Progress. Bei 114 dieser Patienten lag ein Progress in einen höhergradigen MDS-Subtyp vor, und bei 54 Patienten ein Progress in eine CMML.

CMML-Progressanteil der Patienten mit Monozytenpopulation

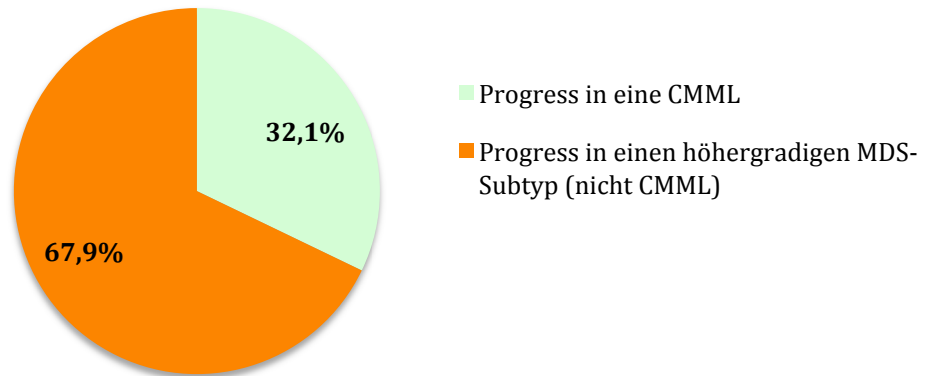


Abbildung 2 CMML-Progressanteil der Patienten mit Monozytenpopulation.

Abbildung 2 zeigt den CMML-Progressanteil, 32,1% der Progresspatienten hatten eine Transformation in eine CMML.

4.1.2.1.2 Patienten ohne Monozytenpopulation

Insgesamt fand sich bei 157 Patienten ein Progress in einen höhergradigen MDS-Typ, 14 dieser Patienten transformierten in eine CMML. Der CMML-Progressanteil beträgt somit 8,9% und wird in Abbildung 3 dargestellt.

CMML-Progressanteil der Patienten ohne Monozytenpopulation

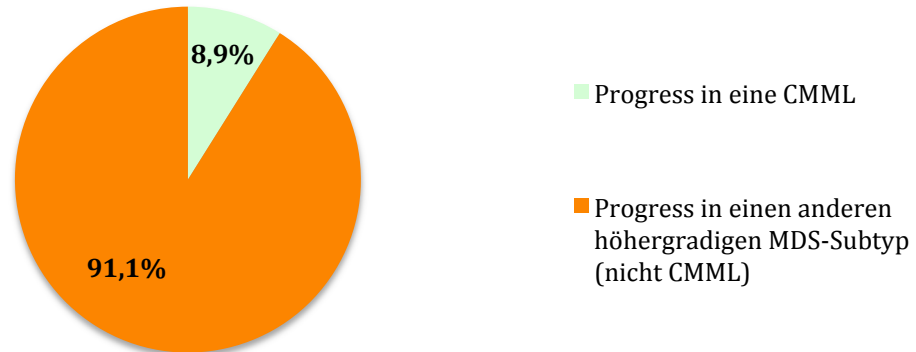


Abbildung 3 CMML-Progressanteil der Patienten ohne Monozytenpopulation.

4.1.3 Progress in eine AML

Die möglichen AML-Transformationen werden in den nächsten beiden Unterpunkten dargestellt.

4.1.3.1 Patienten mit Monozytenpopulation

Eine Transformation in eine AML fand sich bei 323 Patienten des Kollektivs, welches einem prozentualen Anteil von 17,9% entspricht. Die AML-Transformation ist in Abbildung 4 veranschaulicht.

AML-Transformation von Patienten mit Monozytenpopulation

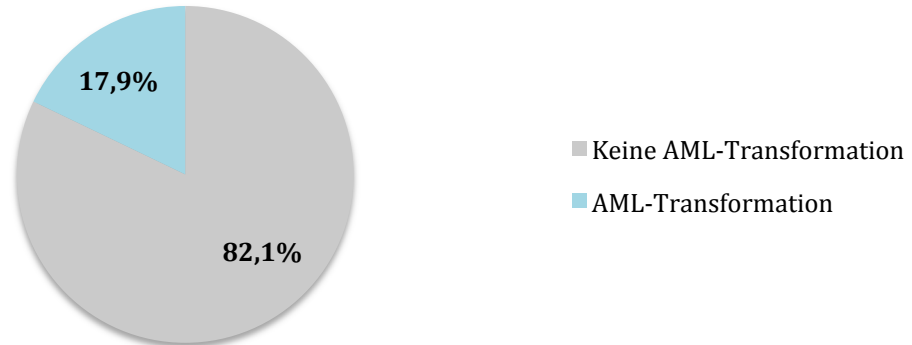


Abbildung 4 AML-Transformation von Patienten mit Monozytenpopulation.

4.1.3.2 Patienten ohne Monozytenpopulation

Innerhalb der Kontrollgruppe progressierten 619 Patienten in eine AML. Diese Transformationsrate zeigt Abbildung 5.

AML-Transformation von Patienten ohne Monozytenpopulation

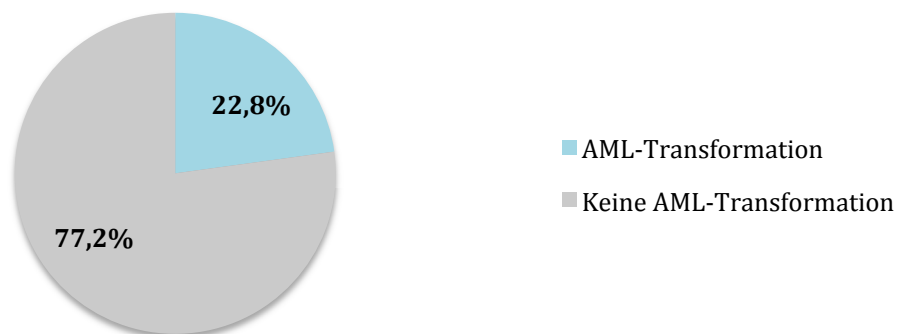


Abbildung 5 AML-Transformation von Patienten ohne Monozytenpopulation.

Es fand sich bei 22,8% der Patienten ohne Monozytenpopulation eine Transformation in eine AML.

4.1.4 Vergleich der Progressraten

Tabelle 7 zeigt den Vergleich der Patientengruppen hinsichtlich ihrer Prozesse einschließlich der Signifikanz der Chi-Quadrat-Tests. Die Nullhypothese kann jedes Mal abgelehnt werden.

Auffallend ist der signifikante Unterschied der Transformationsraten in eine CMML. In dem Patientenkollektiv mit bereits vorhandener Monozytenpopulation transformieren im zeitlichen Verlauf 32,1% der Patienten in eine CMML. Diese Transformationsrate ist fast viermal (3,6) so groß wie die der Vergleichsgruppe.

Progressstyp	Patienten mit Monozytenpopulation	Patienten ohne Monozytenpopulation (Kontrollgruppe)	p-Wert (zweiseitiger, exakter Test nach Fisher)
AML	17,9%	22,8%	<0,0005
CMML	32,1%	8,9%	0,002
Anderer höhergradiger MDS-Subtyp (nicht CMML)	67,9%	91,1%	0,002

Tabelle 7 Progressraten der unterschiedlichen Progressarten von Patienten mit und ohne Monozytenpopulation, Legende: AML=Akute myeloische Leukämie, CMML=chronisch myelomonozytäre Leukämie, MDS=Myelodysplastische Syndrome.

In Abbildung 6 ist zur besseren Übersicht die Verteilung der Patienten ohne Progress (grau), mit einem Progress in eine CMML (grün), einem Progress in eine AML (blau) oder einem Progress in einen anderen höhergradigen MDS-Subtyp (orange) dargestellt.

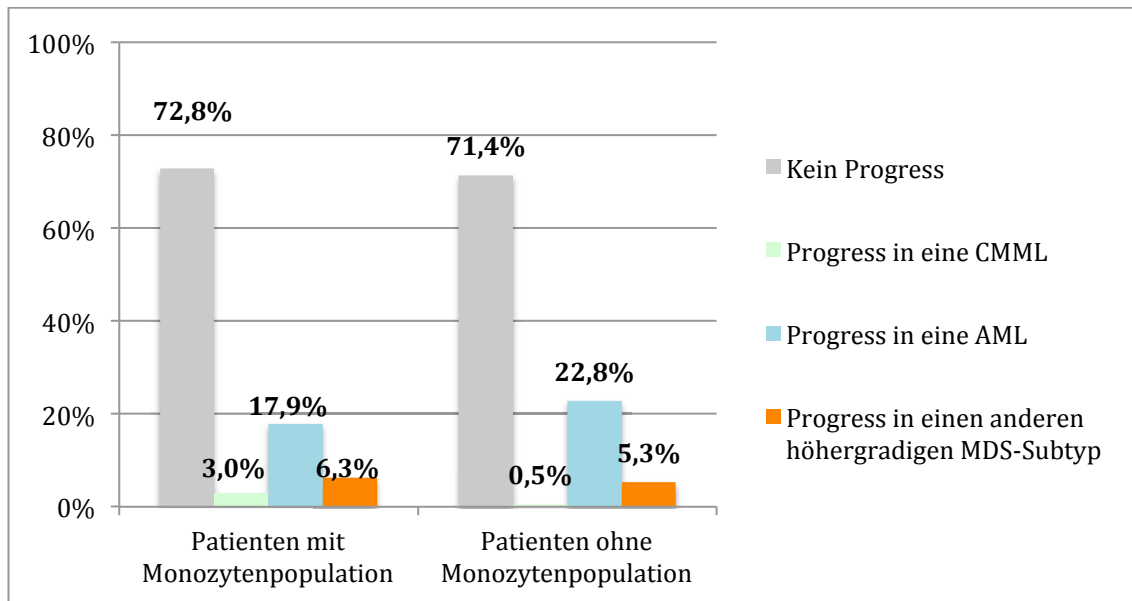


Abbildung 6 Vergleich der Progressraten (in Prozent) von Patienten mit und ohne Monozytenpopulation.

Insgesamt fand sich bei 491 Patienten mit Monozytenpopulation eine Transformation jeglicher Art, womit 1316 Patienten keinen Progress im Verlauf entwickelten. In der Vergleichsgruppe transformierten insgesamt 776 Patienten, während 1934 keinen Progress irgendeiner Art durchliefen.

4.1.5 Molekulargenetische Untersuchung

Eine molekulargenetische Untersuchung wurde bei jeweils 20 Patienten mit und ohne Monozytenpopulation durchgeführt. Hierbei wurden die Gene ASXL1, RUNX1, NRAS, TET2, SRF2, SETBP1 auf Mutationen hin untersucht, da Patienten mit einer CMML häufig eine oder mehrere Mutationen dieser Gene aufweisen.

4.1.5.1 Molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit Monozytenpopulation

Tabelle 8 zeigt die Ergebnisse der molekulargenetischen. Eine gefundene Mutation wird durch ihre biologische Codierung dargestellt. Die Zahlen am Anfang des Codes geben die Position der Mutation innerhalb der DNA-Sequenz des Gens an. Die Buchstaben danach geben Aufschluss über die Art der Mutation. So bedeutet

beispielsweise c4134T>G, dass an der Stelle 4134 die Nukleoninbase Guanin durch Thymin ausgetauscht wurde. C1263delA zeigt, dass es an Position 1263 zu einer Deletion des Nukleosids Adenosin kam. Die Allelfrequenz der mutierten Gene wird hinter den Mutationen in Prozent angegeben. Bei fünf Patienten (Nr. 2,4,7,16 und 20) wurden keine Mutationen gefunden. Am häufigsten, nämlich bei 12 Patienten, fand sich eine Mutation von TET2; bei sieben dieser Patienten fanden sich mindestens 2 Mutationen von TET2. Interessanterweise hatte jeder Patient mit einer TET2-Mutation jeweils eine unterschiedliche Mutation. Es fand sich keine bislang unentdeckte Neumutation.

Pat.	ASXL1	NRAS	RUNX1	SETBP1	SRFS2	TET2
1	-	-	-	-	-	c.4134T>G (44%) c.4870C>T (45,5%)
2	-	-	-	-	-	-
3	c.2197C>T (48,5%)	-	c.955dupC (41,8%)	-	c.284C>A (43,7%)	c.1263delA (41,5%), c.3662G>A (47,8%)
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	c.4354C>T (69,8%)
6	c.1934dupG (30,2%)	c.38G>T (31,2%)	-	c.2608G>A (34,6%)	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	c.1892C>A (26,8%), c.4983T>A (10,5%), c.5731A>T (34,7%)
9	c.1934dupG (36,7%)	-	-	-	-	c.3501-7_3501-4delCTTT (44,4%)
10	-	-	-	-	c.287C>T (4,4%)	c.1173delC (32,6%)
11	c.1934dupG (35,7%), c.4465T>C (50,9%)	-	c.530G>A (29,5%)	-	-	c.1604delA (47%), c.3781C>G (44,4%)
12	-	-	-	-	c.284C>T (48%)	c.1842del (4,3%), c.4860_4866delGCTTTT G, (49,3%) c.5182G>T(39,2%)
13	c.1773C>A (23,6%)	-	-	-	c.284C>A (6,9%)	c.4624C>T (7,1%)
14	-	-	-	-	-	c.3443A>G (3%), c.3579T>A (52,9%)
15	c.1934dupG (34,3%)	-	-	-	-	-

16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	c.521G>A (35,2%)	-	c.243C>A (3,8%), c.243C>G (3,1%)	c.3410-28_3410-16 delAAATAATAATCTT (34,6%), c.3410-9T>G (35,1%)
18	-	c.35G>A (36,3%)	c.424dupA (39,2%), c.538C>T (3,1%), c.589C>T (6,9%)	-	-	-
19	-	c.131T>C (5,7%), c.195T>A (3,8%)	-	-	-	c.878_890 delGTGAGGCCTGTGA (48,2%), c.5611A>T (3,1%)
20	-	-	-	-	-	-

Tabelle 8 Molekulare Charakteristika von Patienten mit Monozytenpopulation, Legende: Hinter den Mutationen wird die Allelfrequenz fettgedruckt in Prozent in Klammern angegeben. ASXL1=Additonal sex comb like 1, NRAS= Neuroblastoma RAS viral oncogene homologe, RUNX1= Runt-related transcription factor 1, SETBP1=SET binding protein 1, SRFS2=Serine and Arginine rich splicing factor 2, TET2= Tet methylcytosine dioxygenase 2, c.131=Position131, T=Thymin, G=Guanin, A=Adenin, C=Cytosin, > = Austausch, del=Deletion, dup=Duplikation, Pat.=Patient.

4.1.5.2 Molekulargenetische Untersuchung von Patienten ohne Monozytenpopulation

In der Vergleichsgruppe wurden ebenfalls bei 20 Patienten eine molekulargentische Untersuchung durchgeführt.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Pat.	ASXL1	NRAS	RUNX1	SETBP1	SRFS2	TET2
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	c.3974delA (3,2%)
5	-	-	-	-	-	-
6	c.1934dupG (18,4%)	-	-	-	c.284C>A (26%)	-
7	-	-	-	-	-	-
8	c.1900_1922del (13,9%)	-	c.63C>T (40,8%)	-	-	-

9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	c.100C>T (48,6%)
11	c.3207A>G (47,7%)	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	c.1900_1922del (22,6%)	c.155T >C (2,9%)	c.341C> T (3,5%) , c.580T> C (4,3%)	c.2704C>T (1,4%)	c.284C>T (60,2%)	-
14	c.1930_1934delG GGGG (24,6%)	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	c.1736dupT (29%)
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	2608G>A (2.0%)	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9 Molekulare Charakteristika von Patienten ohne Monozytenpopulation, Legende: Hinter den Mutationen wird die Allelfrequenz in Prozent in Klammern und fettgedruckt angegeben. ASXL1=Additional sex comb Like 1, NRAS= Neuroblastoma RAS viral Oocogene homologe, RUNX1= Runt-related transcription factor 1, SETBP1=SET binding protein 1, SRFS2=Serine and Arginine rich splicing factor 2, TET2= Tet methylcytosine dioxygenase 2, c.131=Position131, T=Thymin, G=Guanin, A=Adenin, C=Cytosin, > = Austausch, del=Deletion, dup=Duplikation, Pat.=Patient.

4.1.5.3 Gegenüberstellung der molekulargenetischen Ergebnisse

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung beider Patientengruppen werden in Tabelle 10 miteinander verglichen.

	Patienten mit Monozytenpopulation	Patienten ohne Monozytenpopulation	p-Wert (t-Test)
Anzahl Patienten mit CMML-typischer Mutation	15	9	0,94
Anzahl CMML-typischer Mutationen pro Patient	1 – 3 – 5	1 – 1 – 5	0,013
Allelfrequenz	35% – 34,9% – 69,8%	1,4% – 16,2% – 60,2%	0,064

Tabelle 10 Gegenüberstellung der molekulargenetischen Ergebnisse. Es wird die Range mit dem Median (fettgedruckt) von der Mutationszahl pro Patient bzw. der Allelfrequenz (in %) angegeben, CMML= Chronisch myelomonozytäre Leukämie.

Hierbei zeigt sich, dass im Vergleich zu der Kontrollgruppe die mediane Allelfrequenz der Patienten mit Monozytenpopulation mehr als doppelt so hoch war wie bei den Patienten aus der Kontrollgruppe. Ebenso interessant ist, dass die Zahl der Patienten mit einer Mutation in dem Patientenkollektiv mit Monozytenpopulation fast doppelt so hoch (ca. 40% höher) war.

4.1.6 Kumulatives Überleben

Das kumulative Überleben der beiden Patientengruppen wurde miteinander auf mögliche Abweichungen hin verglichen.

Zuerst wurde evaluiert, ob eine bereits vorhandene Monozytenpopulation im Knochenmark Auswirkungen auf das kumulative Überleben der Patienten hat. Als nächstes wurden mögliche Unterschiede des kumulativen Überlebens der Patientenkollektive aufgrund einer Transformation in eine CMML, AML, einen anderen höhergradigen MDS-Subtyp oder eines jeglichen möglichen Prozesses verglichen.

4.1.6.1 Kumulatives Überleben mit und ohne Monozytenpopulation im Vergleich

Abbildung 7 zeigt das kumulative Überleben der Patientenkohorten auf Grundlage der Kaplan-Meier-Berechnung.

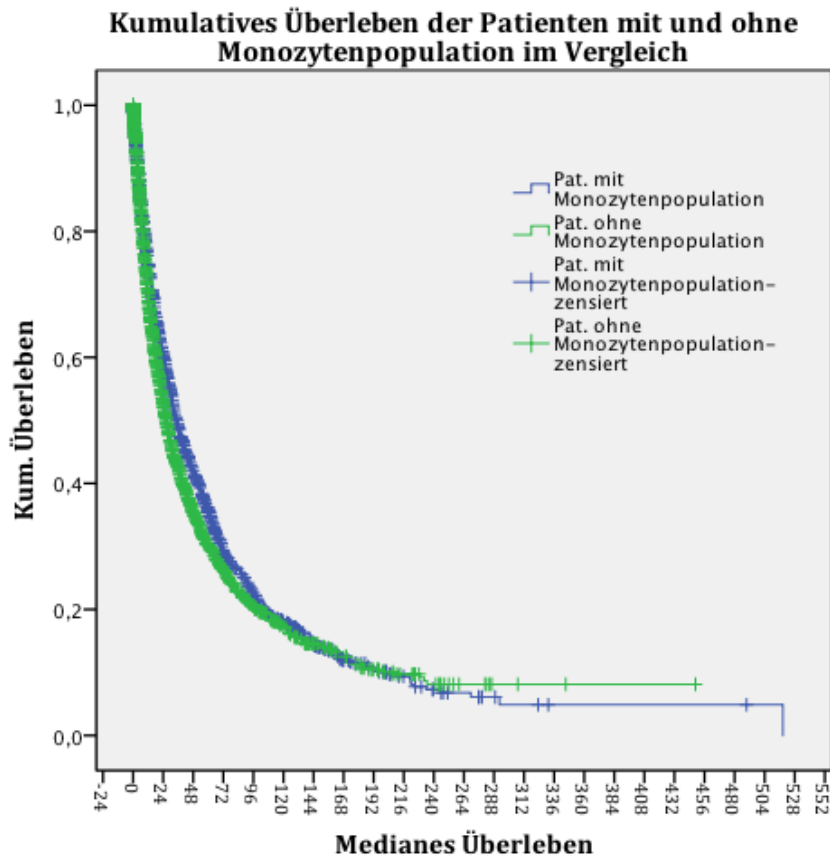


Abbildung 7 Kumulatives Überleben der Patienten mit und ohne Monozytenpopulation im Vergleich, $p=0,003$ (Log Rank).

Wie die Grafik zeigt, unterscheidet sich das Überleben der Patientengruppen nicht signifikant.

4.1.6.2 Kumulatives Überleben mit und ohne CMML-Transformation im Vergleich

Die Abbildungen 8 und 9 stellen das kumulative Überleben der Patienten in Abhängigkeit von einer Transformation in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp dar. Man erkennt, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich

des kumulativen Überlebens der Patientengruppen in Abhängigkeit eines Progresses gibt.

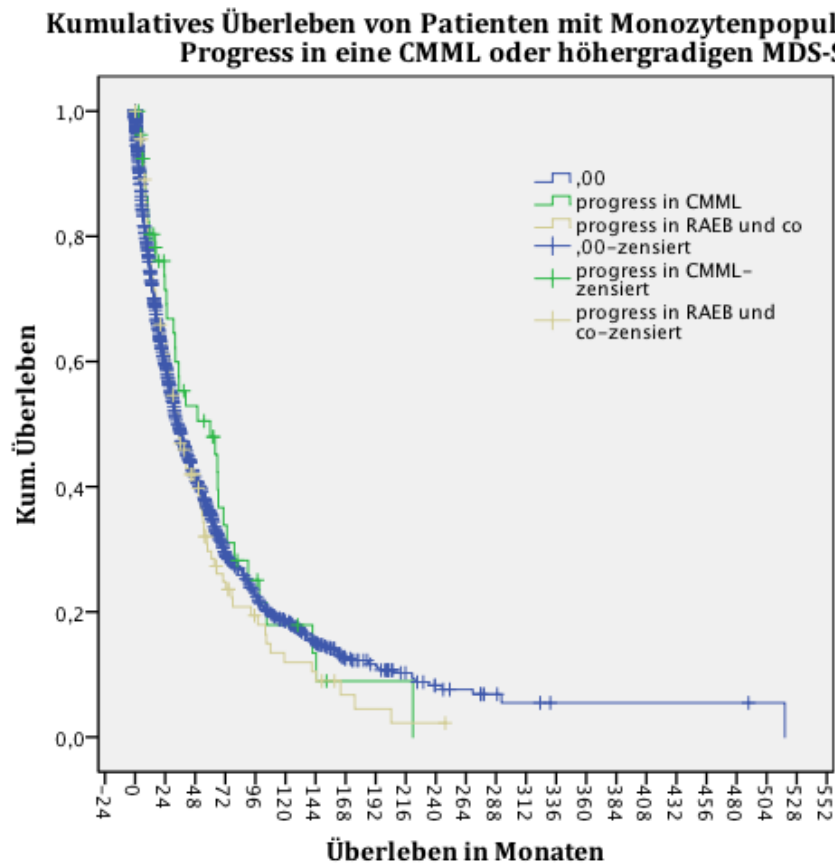


Abbildung 8 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit einem Progress in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp, $p=0,484$ (Log Rank).

Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit einem Progress in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp

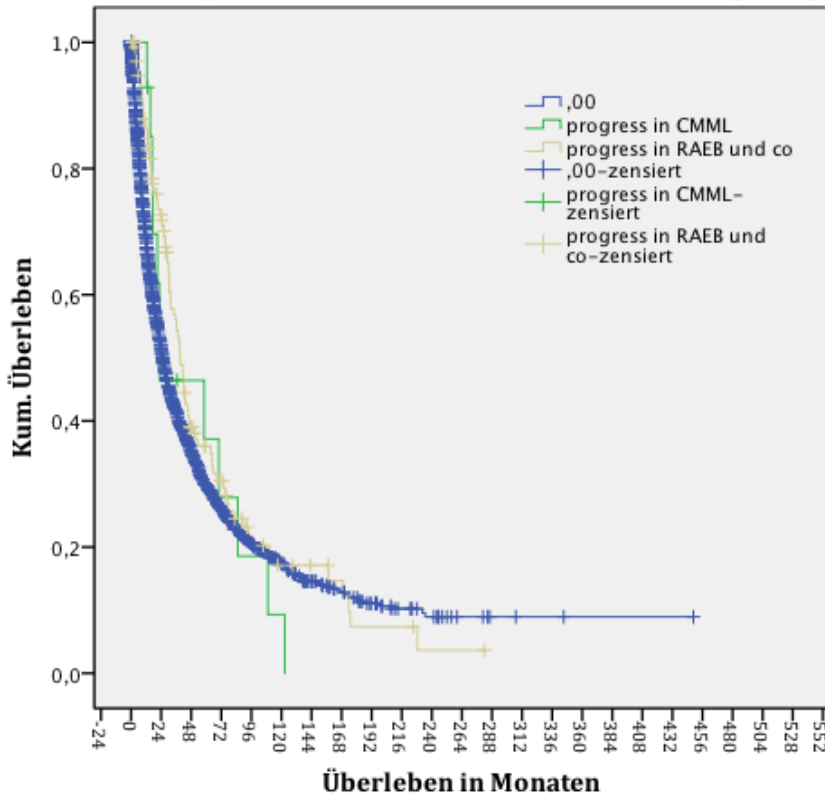


Abbildung 9 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit einem Progress in eine CMML oder einen höhergradigen MDS-Subtyp, $p=0,087$ (Log Rank).

4.1.6.3 Kumulatives Überleben mit und ohne AML-Transformation im Vergleich

Die Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 10 und 11 veranschaulichen das kumulative Überleben von Patienten mit und ohne Monozytenpopulation in Abhängigkeit eines AML-Übergangs. Es zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Überleben der Vergleichskohorten nach einem Progress in eine AML gibt.

Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne AML-Übergang

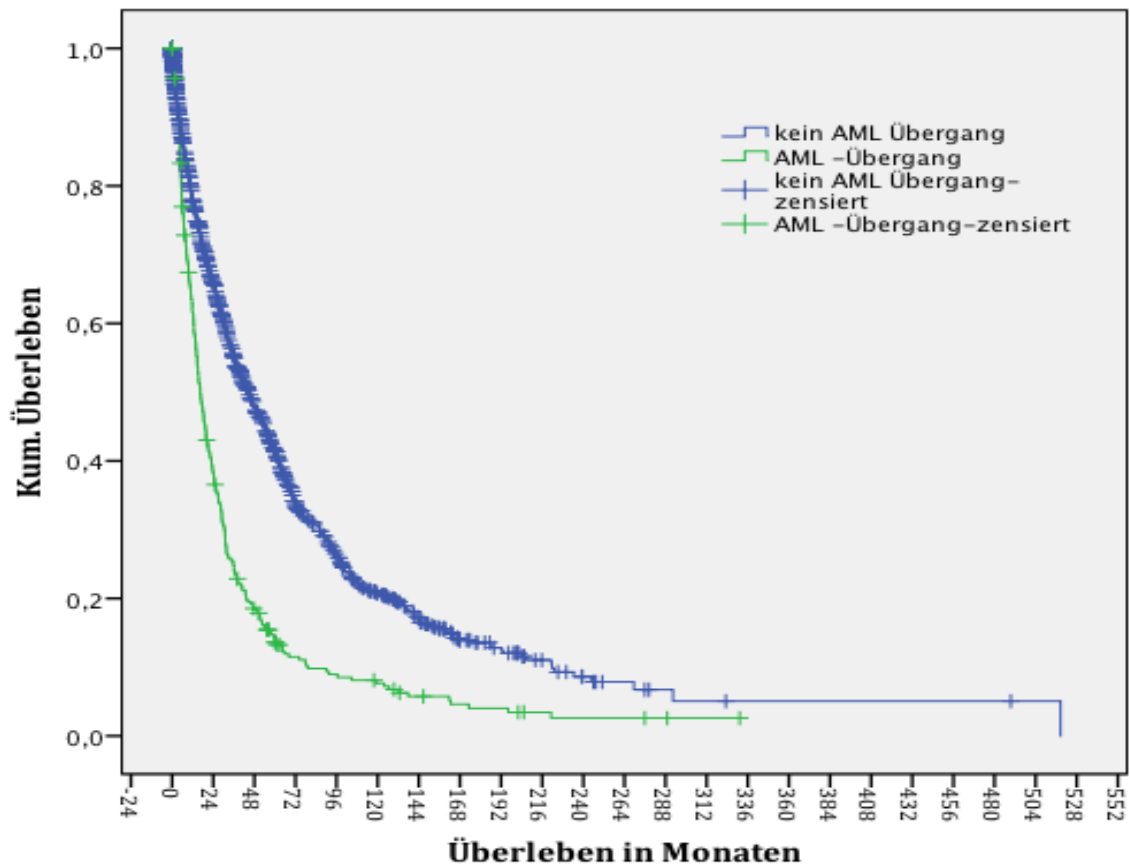


Abbildung 10 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne AML-Übergang, $p=0,0005$ (Log Rank).

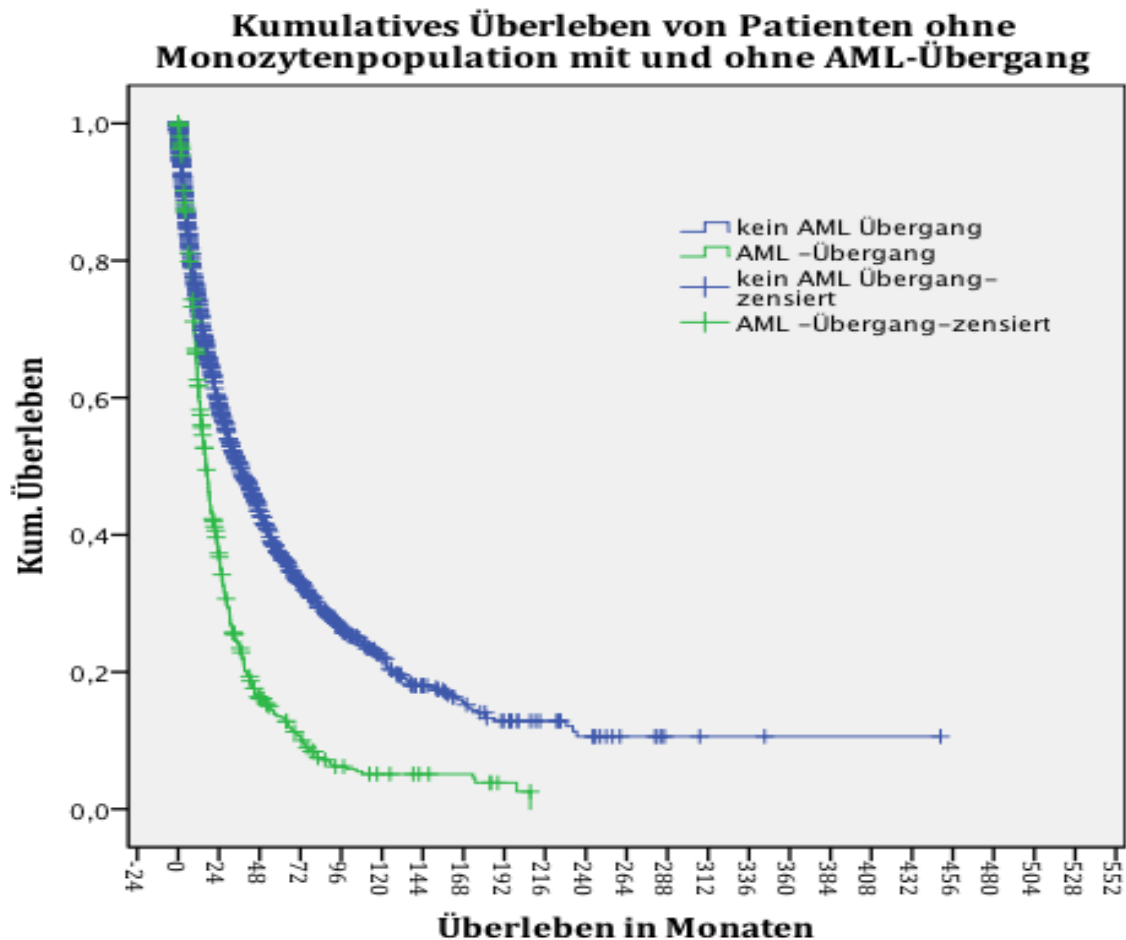


Abbildung 11 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit und ohne AML-Übergang, $p=0,0005$ (Log Rank).

4.1.6.4 Kumulatives Überleben mit und ohne Progress

Die Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 12 und 13 zeigen auf, dass sich das kumulative Überleben der Patientengruppen in Abhängigkeit von der Transformation in eine andere höhergradige MDS-Form oder eine CMML nicht signifikant voneinander unterscheidet.

Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation und einem Progress im Verlauf

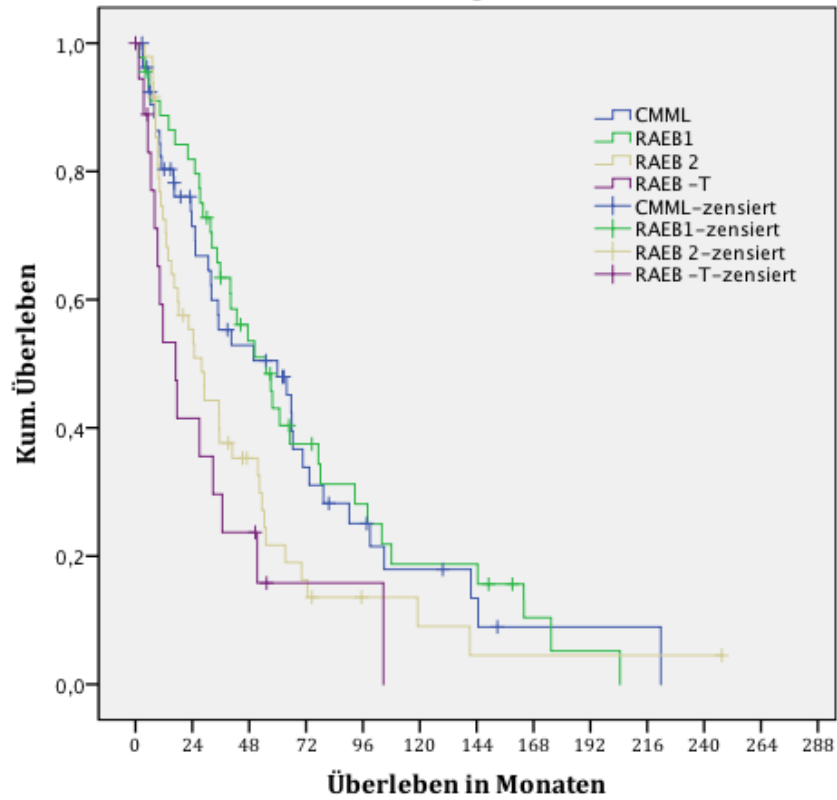


Abbildung 12 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation und einem Progress im Verlauf, $p=0,007$ (Log Rank).

Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation und einem Progress im Verlauf

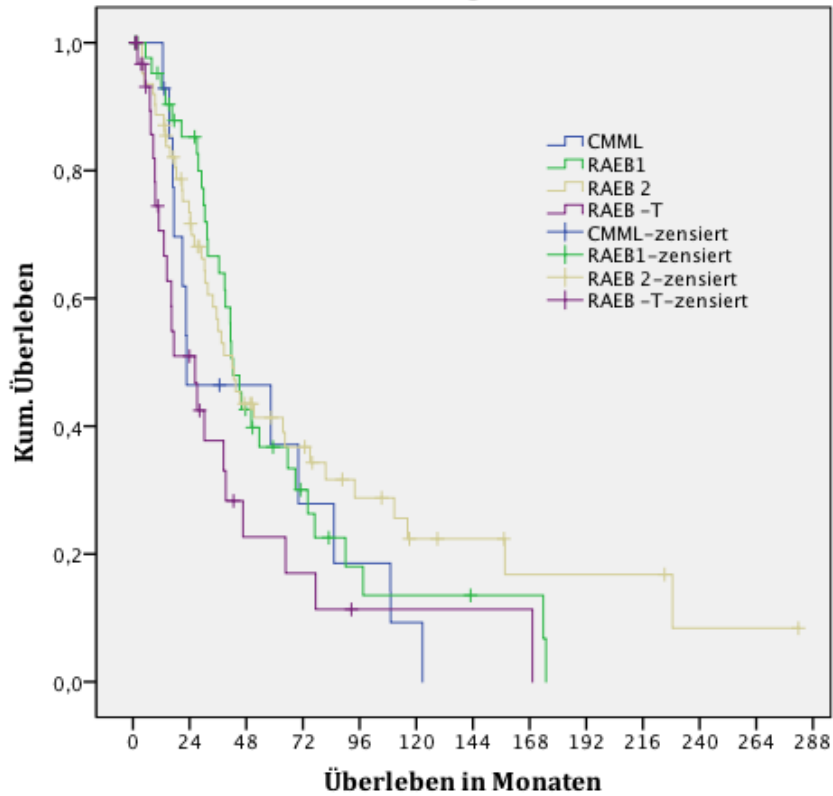


Abbildung 13 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation und einem Progress im Verlauf, $p=0,038$ (Log Rank).

Die Abbildungen 14 und 15 stellen das kumulative Überleben beider Patientengruppen in Abhängigkeit jeglichen Progresses dar.

Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne Progress jeglicher Art

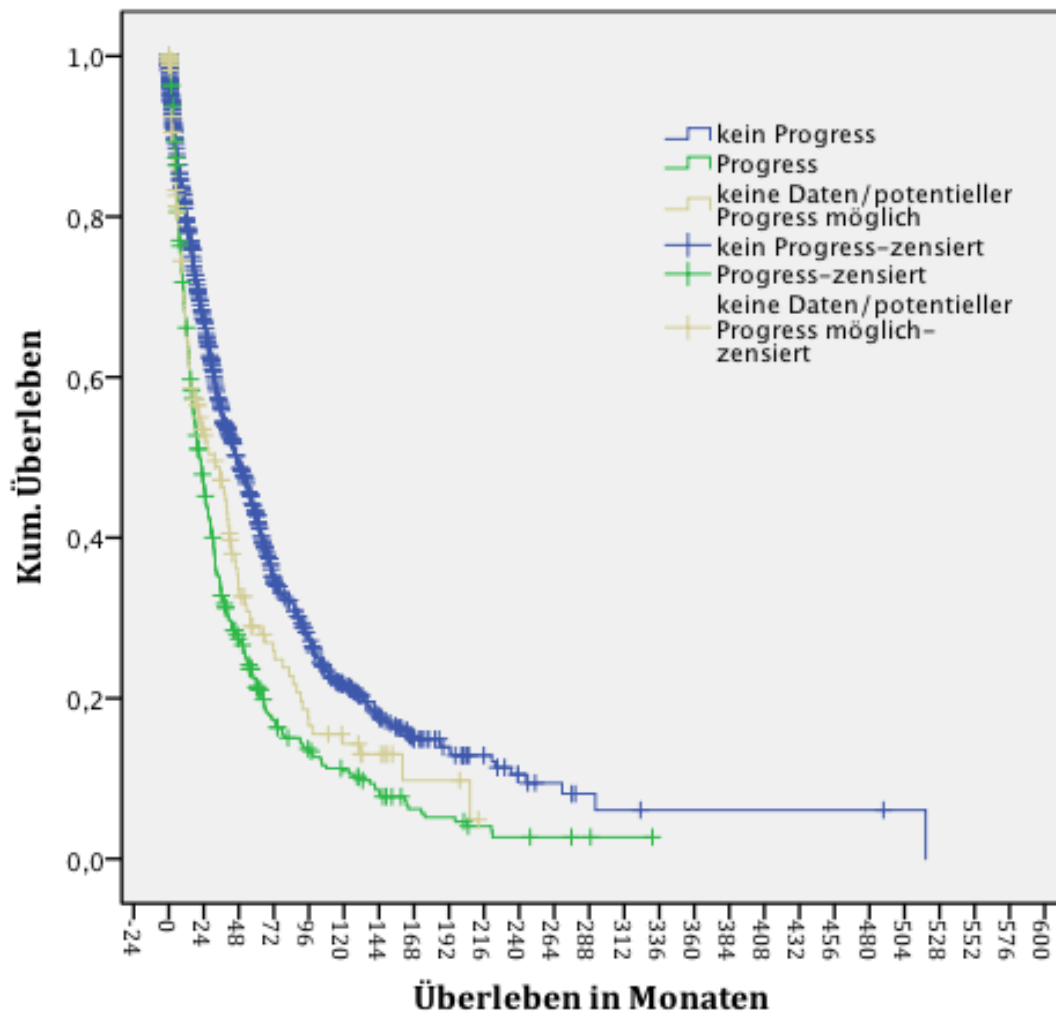


Abbildung 14 Kumulatives Überleben von Patienten mit Monozytenpopulation mit und ohne Progress jeglicher Art, $p=0,0005$ (Log Rank).

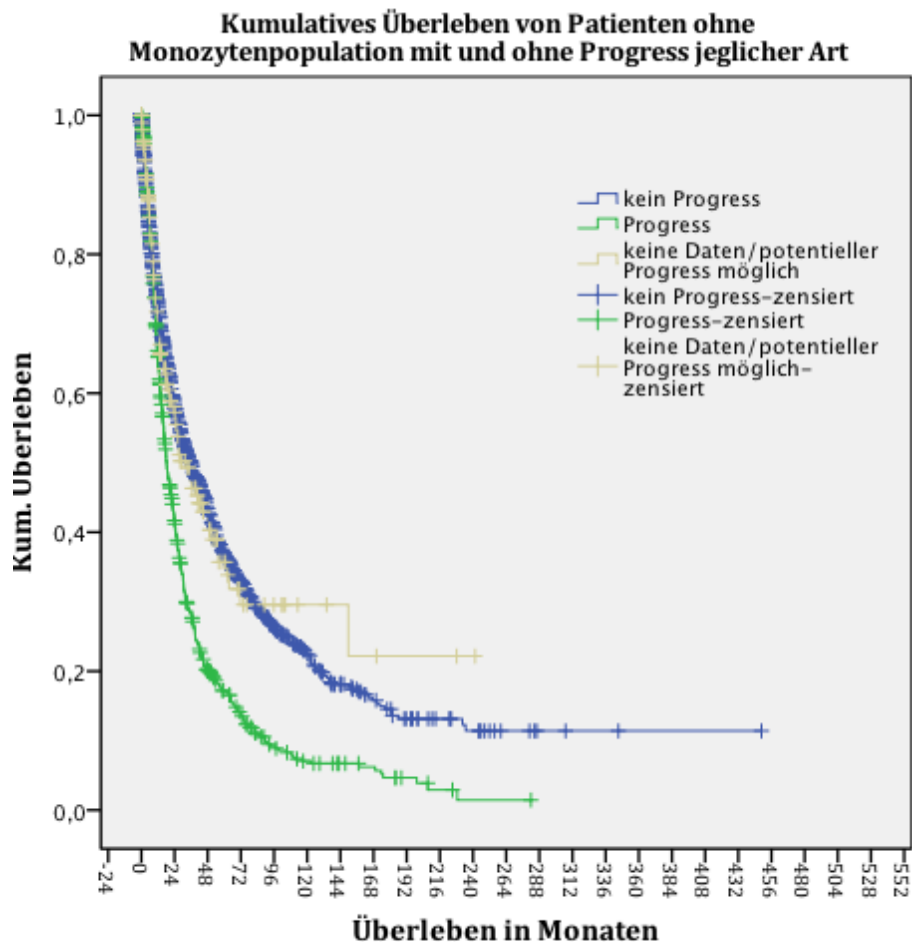


Abbildung 15 Kumulatives Überleben von Patienten ohne Monozytenpopulation mit und ohne Progress jeglicher Art, $p=0,0005$ (Log Rank).

Die Patientengruppen weichen hinsichtlich des kumulativen Überlebens nach einer Transformation jeglicher Art nicht signifikant voneinander ab.

4.2 Patientendaten der kleineren Untersuchungsgruppe mit verfeinerten Auswahlparametern

In einem nächsten Schritt wurden in einer kleineren Untersuchung 183 Patienten mit 100 – 900 μ l Monozyten im peripheren Blut sowie entweder >10% Monozytenproliferation im peripheren Blut oder einem positiven Ersterasdfärbungsergebnis (im folgenden als Gruppe A bezeichnet) und 132 Patienten der Kontrollgruppe (Monozyten im peripheren Blut <100/ μ l sowie

entweder <10% Monozytenproliferation im Knochenmark oder ein negatives Esterasefärbungsergebnis, im folgenden als Gruppe B bezeichnet) miteinander verglichen. Verglichen wurden mögliche Unterschiede hinsichtlich eines Progresses und des molekulargenetischen Profils.

4.2.1 Klinische und epidemiologische Parameter

In Tabelle 11 sind die klinischen und epidemiologischen Parameter sowie die Progressraten in eine CMML und eine AML/RAEB aufgeführt.

Parameter	Gruppe A	Gruppe B	p
Anzahl Patienten	183	132	
Geschlecht (in %)	♂: 55 ♀: 45	♂: 52 ♀: 48	n.s.
Alter in Jahren	34,1 - 71,7 - 91	20 - 67,4 - 93,1	0,005
Hb in g/dl	3,6 - 9,6 - 14,8	4,3 - 9,2 - 14,9	0,009
Thr x 10 ³ /μl	3 - 143 - 1350	3 - 92 - 676	0,008
WBC/μl	600 - 4060 - 36600	200 - 2500 - 10500	<0,0001
Absolute Neu/μl	40 - 1976 - 21690	28 - 1152 - 6789	0,001
Mono/μl	104 - 312 - 900	0 - 40 - 100	<0,0001
LDH in U/l	92 - 187 - 4680	17 - 188 - 837	n.s.
Knochenmarksblasten (%)	0 - 3 - 29	0 - 4 - 29	<0,05
Monozyten im Knochenmark in %	0 - 5 - 42	0 - 0 - 7	<0,0001
Knochenmarkszellularität (Histologie):	n=98	n=92	n.s.
Hpozellular	10,6%	17,4%	
Normozellular	44,9%	31,5%	
Hyperzellular	43,5%	51,1%	
Knochenmarksfibrose	11% (= 9/85)	19% (= 15/81)	n.s.
WHO-Klassifikation in %:			
MDS-SLD	5,0	5,3	
MDS-RS-SLD	8,4	6,8	
MDS del (5q)	4,5	3,8	
MDS-MLD	28,5	28	
MDS-RS-MLD	16,8	7,6	
MDS-EB 1	17,3	19,7	
MDS-EB 2	5	16,7	
RAEB-T	11,7	11,4	
RARS-T	2,8	0,8	
Knochenmarksblasten:			

<5%	65,9	53,	
5-29%	34,1	47	p=0,026
IPSS-R in %:	n=86	n=60	
Sehr niedrig	18,6	3,3	
Niedrig	33,7	18,3	
intermediär	12,8	28,3	
hoch	19,8	23,3	
Sehr hoch	15,1	26,7	
Medianes Überleben in Monaten	35,1	33,7	n.s.
Progressraten:			
CMML	9 (4,9 %)	2 (1,5%)	n.s.
RAEB oder AML	38 (20,8%)	54 (40,9%)	0.001

Tabelle 11 Klinische und epidemiologische Daten der kleineren Untersuchungsgruppe, Legende: Bei den numerischen Werten wurde die Range und der Median (fettgedruckt) angegeben, WBC=White blood cells, Hb=Hämoglobin, Thr=Thrombozyten, Neu=Neutrophile, Mono=Monozyten, LDH= Laktatdehydrogenase, MDS=Myelodysplastische Syndrome, SLD=Single lineage dysplasy MLD=Multilineare Dysplasie, RS=Ringsideroblasten, EB=Blastenexzess, RARS-T=Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten in Transformation, RAEB-T=Refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation, n.s.=nicht signifikant unterschiedlich, WHO=World Health Organisation, IPSS=International prognostic scoring system, CMML=Chronisch myelomonozytäre Anämie, AML=Akute myeloische Anämie.

Es fand sich keine signifikante Diskrepanz im medianen Überleben der Patienten aus den beiden Gruppen, wobei sich die periphere Monozytenzahl und die Monozyten im Knochenmark signifikant voneinander unterschieden.

4.2.2 Progress

Die Progressraten in eine CMML oder eine AML/RAEB wurden in der kleineren Untersuchungsgruppe evaluiert. Erstaunlicherweise unterscheiden sich die Progressraten in eine CMML nicht signifikant voneinander, während Patienten der Gruppe B eine fast zweimal so hohe AML/RAEB-Transformationsrate und somit eine signifikante Transformationsrate im Vergleich zu Patienten der Gruppe A hatten. In Diagramm 16 kommen diese Ergebnisse zur Darstellung.

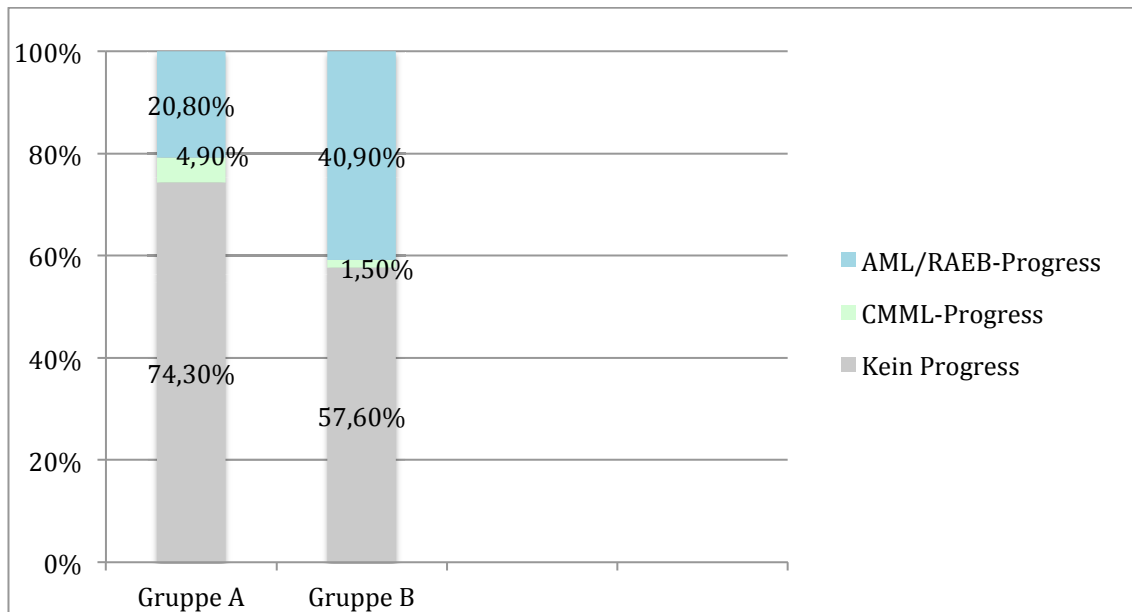


Abbildung 16 Progressraten der kleineren Untersuchungsgruppe.

4.2.3 Molekulargenetische Untersuchung

Auch in der kleineren Untersuchungsgruppe wurde die DNA von jeweils 20 Patienten der Gruppe A bzw. B stichprobenartig ausgewählt und molekulargenetisch untersucht. Die untersuchten Gene waren: ASXL1, RUNX1, TET2, NRAS, SETBP1 sowie SRFS2. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung, wobei nur die Patienten mit Mutationen aufgeführt werden. In Gruppe A fanden sich 14 Patienten mit mindestens einer Mutation. Dies entspricht 70% aller molekulargenetisch untersuchten Patienten der Gruppe A. In Gruppe B fanden sich hingegen 11 Patienten (55%) mit mindestens einer Mutation. Die Abweichung der Patientenzahl mit mindestens einer Mutation zwischen Gruppe A und Gruppe B ist mit einem p-Wert von 0,005 signifikant.

Pat.	ASXL1	NRAS	RUNX1	SETBP1	SRFS2	TET2
Gruppe A						
1	c.1934dupG (30,2%)	-	-	-	-	-
2	c.1934dupG (39,3%)	-	c.285_286dupGG (35,4%)	-	c.284C>A (43,9%)	c.3410-4A > G (8,1%)
3	-	-	-	-	c.284C > A (49%)	-
4	c.1934dupG (34,5%)	c.985dupT (34,1%)	-	-	-	c.937dupA (43,4%) c.3646C > T (35,2%)
5	-	-	-	-	c.284C>A (42,2%)	c.2918dupG (38,5%)
6	c.2197C>T (48,5%)	-	c.955dupC (41,8%)	-	c.284C>A (43,7%)	c.1263delA (41,5%) c.3662G>A (47,8%)
7	-	-	-	-	-	c.4354C>T (69,8%)
8	c.1934dupG (30,2%)	c.38G>T (31,2%)	-	2608G >A (34,6%)	-	-
9	-	-	-	-	c.287C>T (4,4%)	c.1173delC (32,6%)
10	c.1934dupG (35,7%) c.4465T>C (50,9%)	-	c.530G>A (29,5%)	-	-	c.1604delA (47%) c.3781C>G (44,4%)
11	-	-	-	-	-	c.3443A>G (3%) c.3579T>A (52,9%)
12	c.1934dupG (34,3%)	-	-	-	-	-
13	-	c.35G>A (36,3%)	c.424dupA (39,2%) c.538C>T (3,1%) c.589C>T (6,9%)	-	-	-
14	-	c.131T>C (5,7%),	-	-	-	c.878_890 delGTGAGGCCTGTGA

		c.195T>A (3,8%)				(48,2%) c.5611A>T (3,1%)
Gruppe B						
1	-	-	-	-	c.-2C>A (46,3%)	c.1334delT (49,1%) c.3373A>G (3,2%) c.3803 + 1_3803 + 2insT (49,0%)
2	-	-	-	-	-	c.3490delA (2,8%)
3	c.1934dupG (25,7%)	-	-	-	c.283C>G (22,2%)	-
4	c.1934dupG (37,4%)	-	c.415C>T (38,1%)	-	c.284C>A (47,5%)	-
5	-	-	c.877C>T (3,2%)	c.2704C>T (1,4%)	c.284C>T (60,2 %)	-
6	c.1934dupG (36,4%)	c.35G>A (27%) c.38G>A (8,8%)	c.926T>C (18,3%) c.930dupC (17,9%)	-	-	c.4343delG (45%)
7	-	-	-	c.2644G>A (3,3%)	-	c.3373A>G (3,3%) c.4048G>T (5%)
8	-	-	-	-	-	c.1267A>T (71,9%)
9	c.1934dupG (37,9%)	-	-	-	c.284C>T (32,1%)	-
10	c.3578G>A (44,4%)	-	-	-	-	-
11	-	-	-	c.238C>G (10,8%)	c.2608G>A (12,1%)	c.3251A>C (46,7%)

Tabelle 12 Molekulargenetische Ergebnisse der kleineren Untersuchungsgruppe, Legende: Hinter den Mutationen wird die Allelfrequenz in Prozent in Klammern und fettgedruckt angegeben. ASXL1=Additonal sex comb like 1, NRAS= Neuroblastoma RAS viral oncogene homologe, RUNX1= Runt-related transcription factor 1, SETBP1=SET binding protein 1, SRFS2=Serine and Arginine rich splicing factor 2, TET2= Tet methylcytosine dioxygenase 2, c.2608=Position2608, T=Thymin, G=Guanin, A=Adenin, C=Cytosin, > = Austausch, del=Deletion, dup=Duplikation, Pat.=Patient.

Ferner traten bei 70% der Patienten der Gruppe A und somit öfter als bei Patienten der Gruppe B (55%) mehrere (=mindestens zwei) Mutationen auf. Zum Beispiel betrug die Mutationsfrequenz der Gene TET2 und SRFS2 45% bzw. 25% in der Gruppe A, während sie jeweils 30% bzw. 20% in der Gruppe B war.

4.3 Fazit der Ergebnisse

Imponierend ist, dass sich die Patientengruppen der größeren Untersuchung hinsichtlich ihrer CMML-Transformationsrate signifikant voneinander unterscheiden. So haben zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose Patienten mit bereits vorhandener Monozytenpopulation im Knochenmark eine knapp viermal höhere Transformationsrate. Die molekulare Untersuchung zeigte auf, dass Patienten mit Monozytenpopulation eine signifikant höhere Allelfrequenz der untersuchten Gene aufwiesen als die Patienten der Kontrollgruppe. Auch die Patientenzahl mit Mutationen unterschied sich signifikant voneinander: Fast doppelt so viele Patienten mit Monozytenpopulation als Patienten ohne Monozytenpopulation hatten zumindest eine Mutation. Erstaunlich ist, dass sich das kumulative Überleben der Patienten in Abhängigkeit von spezifischen und jeglichen Prozesse dennoch nicht voneinander unterscheidet.

Die Ergebnisse der kleineren Untersuchungsgruppe machen deutlich, dass molekulargenetische Veränderungen, welche typisch für eine CMML sind, signifikant häufiger bei Patienten mit Monozytenproliferation im Knochenmark (Gruppe A) auftreten als bei Patienten ohne solche Proliferation.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden zwei Patientengruppen mit MDS miteinander verglichen. Sie unterschieden sich dahingehend, dass eine Gruppe zum MDS-Erstdiagnosezeitpunkt eine Monozytenpopulation im Knochenmark und eine leichte periphere Monozytose (ohne die CMML-Kriterien zu erfüllen) aufwies. Zusätzlich wurden zwei weitere kleinere Patientengruppen mit restriktiveren Auswahlkriterien als die erstgenannten Patientengruppen miteinander verglichen. Vergleichskriterien waren die klinischen Beschwerden, die Progressraten in eine CMML, AML und andere höhergradige MDS-Formen sowie molekulare Charakteristika und das kumulative Überleben der Patienten. Hierbei zeigte sich, dass Patienten des größeren Kollektivs mit bereits vorhandener Monozytenpopulation zum MDS-Diagnosezeitpunkt eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit hatten, in eine CMML zu transformieren (32,1% zu 8,9%). Allerdings unterschieden sich die Patientenkollektive im Hinblick auf das kumulative Überleben nicht.

5.1 Progress in eine CMML

Bislang gibt es noch keine Studie zu möglichen Transformationen in eine CMML von MDS-Patienten mit und ohne Monozytenpopulation im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose. In einer Studie der Heinrich-Heine-Universität aus dem Jahr 2012 wurde aufgezeigt, dass es einen Anteil an MDS-Patienten mit erhöhten Monozytenwerten im peripheren Blut gibt. (20) In der vorliegenden Arbeit wurden diese Patienten auf eine mögliche CMML-Transformation untersucht. Es zeigte sich, dass 32,1% der Patienten mit bereits vorhandener Monozytenpopulation in eine CMML übergangen, während der entsprechende Anteil für Patienten ohne Monozytenpopulation 8,9% betrug. Anhand dieses signifikanten Unterschiedes wird deutlich, dass eine bereits vorhandene Monozytenpopulation im Knochenmark zum Zeitpunkt der MDS-Erstdiagnose ein Risikofaktor für einen Übergang in eine CMML ist. Es ist ebenfalls möglich, dass

MDS-Patienten mit einer bereits vorhandenen Monozytenpopulation bereits im Transformationsprozess in eine CMML sind oder eine frühe Form der CMML darstellen, ohne dass sie bislang die diagnostischen CMML-Kriterien erfüllt hätten. Dieses Ergebnis wirft daher die Frage auf, inwieweit der aktuelle diagnostische Algorithmus der CMML überarbeitet werden sollte. Aktuell wird die Diagnose CMML gestellt, sobald mögliche Differentialdiagnosen (z.B. viraler Infekt, CML) einer persistierenden (>3 Monate) relativen (>10%) und absoluten (>1000/ μ L) Monozytose ausgeschlossen sind. Molekulargenetische, histo- und zytomorphologische Veränderungen des Knochenmarks sind in diesem Algorithmus von untergeordneter Bedeutung. (29) Zytomorphologische Veränderungen im Knochenmark, z.B. eine bereits vorhandene Monozytenpopulation, dienen bislang als Sicherung der Diagnose auf der Grundlage des Differentialblutbilds. (29) Die Ergebnisse dieser Arbeit regen allerdings eine Veränderung des Diagnosestandards an. Man könnte beispielsweise den Algorithmus so verändern, dass die Diagnose CMML bereits gestellt werden kann, wenn:

- eine Monozytenpopulation im Knochenmark mit leichter, absoluter Monozytose (100 - 999/ μ L) im peripheren Blut vorliegt oder
- eine Monozytenpopulation im Knochenmark mit relativer Monozytose im peripheren Blut vorliegt.

Eine absolute Monozytose ist abhängig von der Leukozytenzahl. Bei einer deutlichen Leukopenie (ausgelöst durch die myeloische Dysplasie), zum Beispiel 2000 WBC/ μ L, kann eine absolute Monozytose erst ab einem sehr hohen prozentualen Monozytenwert, im vorliegenden Beispiel >50%, erreicht werden. Gleichzeitig wäre ein relativer Monozytenwert von 40% bei einer Leukozytenzahl von 2000/ μ L pathologisch und dringend CMML-verdächtig, obwohl die aktuellen Diagnosekriterien einer absoluten und relativen Monozytose nicht erfüllt werden. Dies stützt den Vorschlag, eine CMML diagnostizieren zu können, wenn eine vorliegende relative Monozytose ohne gleichzeitige absolute Monozytose, vor allem bei deutlicher Leukopenie und vorhandener Monozytenpopulation im Knochenmark, vorliegt. Man könnte ein an die Gesamtleukozytenzahl adaptiertes System einführen. So könnte bei deutlichen Leukopenien die relative Monozytose

höher gewichtet werden, und bei deutlicher Leukozytose könnten die absolute und relative Monozytose gleich gewichtet werden. Der Schweregrad der Leukopenie könnte umgekehrt proportional zur Gewichtung der relativen Monozytose sein. Bei einer hochgradigen Leukopenie würde die relative Monozytose stärker gewichtet werden als bei einer leichtgradigen Leukopenie.

Die zytomorphologische Knochenmarksuntersuchung mit Nachweis einer Monozytenpopulation würde eine höhere Gewichtung bekommen und eine *conditio sine qua non* darstellen.

Im Hinblick auf die in der Literatur dargestellte niedrigere Überlebensrate der Patienten mit CMML im Vergleich zu den Patienten mit MDS ist eine engmaschige Kontrolle des Differentialblutbildes der Patienten mit Monozytenpopulation zur Verlaufsbeobachtung angemessen.(23) Bei einer engmaschigen Blutbildkontrolle besteht die Möglichkeit, den CMML-Progress frühestmöglich zu erkennen, so dass eine Umstellung der Therapie bzw. eine Therapieeskalation ebenso früh in Erwägung gezogen werden kann. Eventuell könnte diese therapeutische Reaktion auf die Transformation einen positiven Einfluss auf die in der Literatur dargestellte niedrigere Überlebensrate der CMML-Patienten haben.

5.2 Progress in eine AML

In der Literatur wird die AML-Entartungswahrscheinlichkeit von MDS-Patienten mit circa 20–30% angegeben. (14) Ein möglicher Unterschied der AML-Entartungswahrscheinlichkeit, bedingt durch eine bereits vorhandene oder nicht vorhandene Monozytenpopulation, ist noch nicht untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keinen signifikanten Unterschied des kumulativen Überlebens nach einer AML-Transformation sowie keinen signifikanten Unterschied der AML-Transformationsrate in beiden Patientengruppen. In beiden Patientenkollektiven sind 50% der Patienten mit einer AML-Transformation 24 Monate nach der Transformation verstorben. Es wurde daher nicht bewiesen, ob eine bereits vorhandene Monozytenpopulation ein Risikofaktor für eine Transformation in eine AML ist.

Konsultiert man die Literatur, zeigt sich, dass die AML-Transformationsrate von CMML-Patienten – wie die der MDS-Patienten – bei circa 20–30% liegt. (18) Dies betont die Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen. Gleichzeitig stellt sich deswegen die Frage, inwieweit eine strikte Trennung vonnöten ist.

Proliferative Formen der CMML könnten bereits der Beginn einer Transformation in eine AML sein, da die CMML-MP mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist. (25) Baut man diese Hypothese aus, könnte das bedeuten, dass:

- eine CMML-MD über eine CMML-MP in eine AML transformiert.
- eine CMML-MP die Transformationsform der CMML-MDS ist.

Bei den MDS gibt es ebenfalls Subtypen, die sich in einer AML-Transformation befinden. Ein Transformationssubtyp ist ein Subtyp, der eine starke Proliferation der unreifen Population im Knochenmark aufweist, allerdings noch nicht den Sollwert (>20%) des Blastengehalts einer AML aufweist. Der Anteil an CMML-MP innerhalb der CMML ist laut einer spanisch-italienisch-deutschen Arbeitsgruppe niedriger als der CMML-MD-Anteil (61% - 39%) (28). Dies könnte die Hypothese stützen, dass die CMML-MP-Form die Transformationsform der CMML ist, rapide in eine AML transformieren kann und einen niedrigeren Anteil der CMML-Erkrankungen ausmacht.

Wäre die CMML-MP die Transformationsform der CMML, hätten auch die MDS einen solchen Subtyp. Dies würde auf ein biologisches Kontinuum von CMML und MDS hindeuten und nicht auf zwei verschiedene Krankheitsentitäten. Ein biologisches Kontinuum aus CMML und MDS würde auch die ähnliche AML-Transformationsrate erklären.

5.3 Molekulare Charakteristika

Molekulargenetische Veränderungen finden sich sowohl bei der CMML als auch bei den MDS extrem häufig (>90% CMML (18), 78% – >90% MDS (15)). Interessanterweise finden sich viele Genmutationen bei beiden Erkrankungen. So kommen Mutationen, die für eine CMML typisch sind, auch bei den MDS vor. (18)

(7) Der Unterschied liegt in der Häufigkeit des Auftretens gewisser Genmutationen. Beispielsweise ist bei MDS das am häufigsten mutierte Gen TET2, während es bei der CMML das am zweithäufigsten mutierte ist. (7) (18) Die Frage ist, ob diese molekulargenetische Übereinstimmung darauf hindeutet, dass CMML und MDS zu einem biologischen Kontinuum gehören oder nicht.

Betrachtet man das am häufigsten mutierte Gen bei CMML, die Gene des RAS-Signalweges, fällt auf, dass diese häufiger bei der proliferativen Subform der CMML vorkommen als bei der dysplastischen. (5) (25) Bei den MDS sind Mutationen dieses Signalweges selten (5-10%). (7) Fasst man die Ergebnisse der Literatur zusammen, findet man, dass:

1. Mutationen des RAS-Signalweges zu einer Myeloproliferation führen. (25)
2. Mutationen des RAS Signalweges sich sehr häufig bei einer CMML, vor allem der myeloproliferativen Variante, und selten bei MDS finden. (5)
3. RAS-Mutationen bei MDS mit einem AML-Progress assoziiert sind. (7)
4. Expression der aktivierten und mutierten RAS-Gene in Mäusen zu einer myeloproliferativen tödlich verlaufenden Erkrankung führt. (25)

Nutzt man diese Informationen, könnte man die folgenden Hypothesen bilden:

1. Mutationen des RAS-Signalweges treten während der Myelodysplastogenese – zeitlich gesehen spät auf – und führen auch bei MDS zu einer Myeloproliferation.
2. Die myeloproliferative Wirkung von RAS-Mutationen ist somit nicht CMML-spezifisch oder -pathognomisch.
3. CMML und MDS – sind molekulargenetisch betrachtet – eng verwandt, da eine Myeloproliferation durch den gleichen mutierten Signalweg entstehen kann.

Geht man also davon aus, dass Mutationen des RAS-Signalweges während der Myelodysplastogenese – zeitlich gesehen – spät auftreten, könnte dies bedeuten, dass die myeloproliferative Form der CMML ein Progress innerhalb der Myelodysplastischen Syndrome ist. Möglicherweise ist die myeloproliferative CMML-Form eine im AML-Transformationsprozess befindliche MDS, weil RAS-Mutationen bei MDS mit einem AML-Progress assoziiert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 20 Patienten mit und ohne Monozytenpopulation auf „typische“ CMML-Mutationen (der Gene NRAS, RUNX1, ASXL1, SETBP1, SRFS2, TET2) hin untersucht. In der Patientengruppe mit Monozytenpopulation hatten 15 Patienten mindestens ein mutiertes Gen, von denen 12 mindestens zwei in entweder demselben Gen oder zwei verschiedenen Genen hatten. Von diesen Patienten mit Mutation hatten sieben, also 47% der Patienten mit einer Mutation, einen Progress in eine CMML. In der Patientengruppe ohne Monozytenpopulation hatten 9 von 20 Patienten mindestens ein mutiertes Gen. Bei zwei dieser Patienten fanden sich mindestens zwei Mutationen. Die Ergebnisse der molekularen Untersuchung deuten daraufhin, dass die „typischen“ CMML-Gene Risikofaktoren für eine CMML-Transformation sein könnten, da sich die Zahl der Patienten mit Mutationen sowie die Allelfrequenz der Patientengruppen signifikant voneinander unterscheiden. Somit hätte eine molekulargenetische Untersuchung dieser Gene eine mögliche Bedeutung bei der Prognoseabschätzung.

Außerdem zeigt das molekulargenetische Profil der Patienten mit Monozytenproliferation im Knochenmark (Teil der kleineren Untersuchungsgruppe) eine hohe Mutationsfrequenz der Gene TET2 (60%) und SRFS2 (25%) im Gegensatz zu den Patienten der Kontrollgruppe (jeweils 10%). Eine hohe Mutationsfrequenz der Gene TET2 und SRFS2 ist typisch für eine CMML. (30) (31) Bei MDS ist eine hohe Mutationsfrequenz von TET2 oder SRFS2 nicht typisch. (32) Dies könnte bedeuten, dass MDS-Patienten mit Monozytenproliferation im Knochenmark bereits eine frühe Form der CMML haben bzw. im Transformationsprozess sind, wodurch die Bedeutung der molekulargenetischen Untersuchung deutlich wird.

Aufgrund der niedrigen Anzahl (20 Patienten pro Patientengruppe) der durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen konnte nicht eruiert werden, inwieweit bereits zum MDS-Diagnosezeitpunkt vorliegende „typische“ CMML-Mutationen als Risikofaktoren für eine CMML-Transformation dienen. In einem zukünftigen Forschungsprojekt könnte die Anzahl der Patienten mit Monozytenpopulation, deren DNA molekulargenetisch untersucht wird, erhöht werden. Die statistische Übertragbarkeit der Ergebnisse wird dadurch vergrößert

und ein „Small-Study-Bias“ könnte vermieden werden. Mit einem größeren Patientenpool könnten Genmutationen auf eine mögliche Triggerfunktion in Richtung CMML-Transformation hin untersucht werden. Weiterhin war die angewandte Untersuchungsmethode (ein Next Generation Sequencing Panel) funktional, da das Next Generation Sequencing mit einer Variantenallel-Frequenz von 5-10% sehr sensitiv ist, sodass auch ein geringer Prozentsatz an mutierten Allelen detektiert werden kann. (33)

5.4 Follow-Up

Von 231 Patienten konnten aufgrund fehlender Monozytenverläufe keine Daten gewonnen werden. Zum einem lag dies daran, dass bei manchen Patienten im zeitlichen Verlauf keine weiteren Informationen gewonnen werden konnten, zum anderen daran, dass manche Differentialblutbilder unvollständig in die Patientenakten eingespeichert wurden. Dies bedeutet einerseits, dass wohlmöglich mehr Patienten mit einer Monozytenpopulation im Krankheitsverlauf in eine CMML transformierten, als in dieser Arbeit zu eruieren war. Gleichzeitig werden ebenfalls die Einschränkungen retrospektiv-longitudinaler Studien deutlich, da durch fehlende Daten eine mögliche Dunkelziffer nicht erkannter Progresse entstehen könnte. Aufgrund der hohen Anzahl der Patienten mit Monozytenpopulation (1821) in dieser Arbeit und der im Vergleich dazu nur geringen Anzahl fehlender Information von Patienten (231) ist dieser Mangel in dieser Arbeit wahrscheinlich vernachlässigbar.

Die Diagnose CMML wird aufgrund einer persistierenden (>3 Monate) relativen und absoluten Monozytose gestellt. (25) Die Abhängigkeit der Diagnose von regelmäßigen und dauerhaften Differentialblutbildkontrollen wird dadurch deutlich. Ohne ein Blutbild, ohne den zeitlichen Verlauf der Monozytose sowie ohne den Ausschluss möglicher Differentialdiagnosen (z.B. virale Infektion) kann eine CMML weder erkannt noch bewiesen werden. Ergo ist insbesondere bei Patienten mit bereits vorhandener Monozytenpopulation im Knochenmark eine

regelmäßige und dauerhafte Verlaufskontrolle indiziert, weil diese Patienten eine signifikant erhöhte Transformationsrate (32,1%) haben.

5.5 Ausblick

MDS und CMML unterscheiden sich unter anderem deshalb, weil die CMML auch eine proliferative Komponente aufweist. Inwieweit diese proliferative Form bereits eine CMML in Transformation in eine AML darstellt, ist noch nicht vollständig evaluiert worden. Wäre dies der Fall, könnte von einem biologischen Kontinuum aus MDS/CMML ausgegangen werden, sodass das derzeitige straffe Klassifikationssystem gelockert werden müsste. Die Problematik eines starren Klassifikationssystems ist, dass seltene oder „Ausnahmeerkrankungsformen“ häufig nicht adäquat erkannt und diagnostiziert werden können. Die Gefahr eines starren, sehr detaillierten Systems ist, dass bei zu genauer Betrachtung der Feinheiten die grobe Struktur nicht mehr wahrgenommen wird. Übertragen auf die myelodysplastischen und myelodysplastisch/myeloproliferativen Erkrankungen bedeutet dies, dass der Fokus nicht nur auf die Unterschiede, sondern auch auf die Gemeinsamkeiten (z.B. Ätiologie, Epidemiologie, Klinik, Progressraten, molekulargenetische Merkmale, Therapieoptionen) gelegt werden sollte.

IV. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Germing U, Haas R. Myelodysplastische Syndrome, Bilanz des aktuellen Wissens. University Press, Düsseldorf; 2009.
2. Gupta G, Singh R, Kotasthane DS, Kotasthane VD. Myelodysplastic syndromes/neoplasms: recent classification system based on World Health Organization Classification of Tumors – International Agency for Research on Cancer for Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *J Blood Med.* 2010;1:171-82.
3. Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:264-72.
4. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol.* 2016;91(1):76-89.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
6. Schemenau J, Baldus S, Anlauf M, Reinecke P, Braunstein S, Blum S, et al. Cellularity, characteristics of hematopoietic parameters and prognosis in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2015.
7. Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol.* 2011;29(5):504-15.
8. Matsuo M, Iwanaga M, Kondo H, Soda M, Jo T, Horio K, et al. Clinical features and prognosis of patients with myelodysplastic syndromes who were exposed to atomic bomb radiation in Nagasaki. *Cancer Sci.* 2016;107(10):1484-91.
9. Iwanaga M, Hsu WL, Soda M, Takasaki Y, Tawara M, Joh T, et al. Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. *J Clin Oncol.* 2011;29(4):428-34.
10. Neukirchen J, Schoonen WM, Strupp C, Gattermann N, Aul C, Haas R, et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Dusseldorf MDS-registry. *Leukemia research.* 2011;35(12):1591-6.
11. Fuchs R, Staib P, Brümmendorf T. *Manual Hämatologie.* 24 ed: Nora-Verlag; 2014.
12. Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastische Syndrome: Diagnostik, Prognoseabschätzung und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.* 2013;Heft 46:783-90.
13. Valent P, Horny HP, Bennett JM, Fonatsch C, Germing U, Greenberg P, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia research.* 2007;31(6):727-36.
14. Graubert T, Walter MJ. Genetics of myelodysplastic syndromes: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:543-9.
15. Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood.* 2013;122(25):4021-34.
16. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616-27; quiz 99.

17. Chamseddine AN, Jabbour E, Kantarjian HM, Bohannon ZS, Garcia-Manero G. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Oncol Rep.* 2016;18(1):4.
18. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2016;6:e393.
19. Bennett JM. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2016;16(11):607-9.
20. Germing U, Strupp C, Giagounidis A, Haas R, Gattermann N, Starke C, et al. Evaluation of dysplasia through detailed cytomorphology in 3156 patients from the Dusseldorf Registry on myelodysplastic syndromes. *Leukemia research.* 2012;36(6):727-34.
21. Triantafyllidis I, Ciobanu A, Stanca O, Lupu AR. Prognostic Factors in Myelodysplastic Syndromes. *Maedica (Buchar).* 2012;7(4):295-302.
22. Subari S, Patnaik M, Alfakara D, Gangat N, Elliott M, Hogan W, et al. Patients With Therapy-Related CMML Have Shorter Median Overall Survival Than Those With De Novo CMML: Mayo Clinic Long-Term Follow-Up Experience. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia.* 2015;15(9):546-9.
23. Nazha A, Prebet T, Gore S, Zeidan AM. Chronic myelomonocytic leukemia: Are we finally solving the identity crisis? *Blood Rev.* 2016;30(5):381-8.
24. Elena C, Galli A, Such E, Meggendorfer M, Ulrich G, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *bloodjournal.* 2016;128(10).
25. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res.* 2010;16(8):2246-56.
26. Elena C, Galli A, Such E, Meggendorfer M, Germing U, Rizzo E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2016;128(10):1408-14017.
27. Schuler E, Schroeder M, Neukirchen J, Strupp C, Xicoy B, Kundgen A, et al. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leukemia research.* 2014;38(12):1413-9.
28. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, et al. Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(15):3005-15.
29. Parikh SA, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013;88(11):967-74.
30. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114(1):144-7.
31. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood.* 2012;120(15):3080-8.
32. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2496-506.
33. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer biology & medicine.* 2016;13(1):3-11.

V. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. U. Germing, für die tadellose Betreuung, uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und der Bereitschaft, jederzeit mit Rat und Tat beiseite zu stehen, herzlich bedanken. Mein großer Dank geht weiter an Frau Dr. Schuler für die umfassende Betreuung und freundliche Hilfsbereitschaft, Frau Dr. Betz für die molekulargenetische Auswertung sowie der damit verbundenen Hilfsbereitschaft

Beim Team des MDS-Sekretariates, allen voran Frau Pia Frenken, für das Einarbeiten in das MDS-Register, das angenehme und menschliche Arbeitsklima sowie die Kollegialität möchte ich mich ebenfalls gerne bedanken.

Der gesamten Abteilung der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Klinischer Immunologie gehört mein Dank aufgrund der Freundlichkeit und der zuvorkommenden Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und Freunden gehört mein Dank für die andauernde Unterstützung während des Arbeitsprozesses und den sprachlichen sowie grammatikalischen Hilfestellungen. Namentlich sei an dieser Stelle Frau Nina Dastoglu erwähnt für das Erstellen der Abbildung 1.