

## Aktuelle Labordiagnostik

Oktober 2005

### Chronische myeloische Leukämie (CML)

#### Allgemein

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Auf cytogenetischer Ebene liegt bei ca. 95% der Patienten eine Translokation zwischen einem Chromosom 9 und einem Chromosom 22 vor (Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11)). Die CML ist i. d. R. durch einen dreistufigen Verlauf gekennzeichnet. Die Mehrzahl der Patienten befindet sich bei Diagnose in der chronischen Phase, in der i. d. R. nur die Philadelphia-Translokation nachweisbar ist. Beim Übergang in die akzelerierte Phase oder Blastenkrise treten bei 75-85% der Patienten zusätzliche Chromosomenveränderungen auf (klonale Evolution). Am häufigsten findet man die Trisomie 8 (+8), ein Isochromosom des langen Arms von Chromosom 17 (i(17)(q10)) oder ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom (+der(22)t(9;22)). Das Auftreten von zusätzlichen Chromosomenveränderungen stellt einen prognostisch ungünstigen Parameter dar und wird meist schon mehrere Monate vor der klinischen und hämatologischen Manifestation der Blastenkrise beobachtet.

Mit Einführung neuer diagnostischer Verfahren konnten die molekularen Konsequenzen der Philadelphia-Translokation näher charakterisiert werden. Das auf Chromosom 9 lokalisierte ABL-Gen wird in das auf Chromosom 22 lokalisierte BCR-Gen verlagert. Es entsteht ein BCR/ABL-Fusionsprodukt, das zu einer stark erhöhten Tyrosinkinase-Aktivität führt. Dadurch entarten die hämatopoetischen Stammzellen. Die molekulargenetischen Erkenntnisse führten zu einer neuen Therapieform der CML. Seit wenigen Jahren besteht die Möglichkeit der selektiven Hemmung der BCR/ABL-Tyrosinkinase durch Imatinib (Glivec), welches zum Wachstumsstopp und zur Reduktion der leukämischen Zellen führt. Schon die initialen klinischen Studien haben die Überlegenheit von Imatinib gegenüber herkömmlichen Therapieformen gezeigt. Patienten erreichen in der chronischen Phase hohe hämatologische und komplette cytogenetische Remissionen. Selbst Patienten in der akzelerierten Phase oder Blastenkrise sprechen auf die Imatinibtherapie besser an als auf die bisherigen Standardtherapien. Trotz der guten Erfahrungen mit Imatinib kann bei einer Minderheit der Patienten ein Nichtansprechen auf die Therapie vorliegen. Ursachen sind z.B. genetische Veränderungen, die zu einem Bindungsverlust von Imatinib führen, so dass bei diesen Patienten eine Änderung des Therapieplanes notwendig ist.

#### Diagnose und Therapiekontrolle

Die Diagnose und eine optimale Verlaufskontrolle der CML-Erkrankung verlangt kontinuierliche cytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen, die wir Ihnen als Laborleistung anbieten können. Die von uns im Anhang beschriebene Vorgehensweise bei der Diagnose und das genetische Monitoring nach Therapiebeginn basieren auf bisher publizierten Daten und stellen eine Orientierungshilfe dar (siehe Rückseite).

#### Material

2-5 ml Knochenmarkaspirat (NH<sub>4</sub>-Heparin, Monovette Sarstedt, blau):  
Chromosomenanalyse, Interphase- und Hypermetaphase-FISH, Molekulargenetik (quantitative/nested PCR, Resistenznachweis)  
2x10 ml Heparinblut (NH<sub>4</sub>-Heparin, Monovette Sarstedt, blau):  
Interphase-FISH, Molekulargenetik (quantitative/nested PCR, Resistenznachweis)  
2x10 ml EDTA-Blut:  
Interphase-FISH, Molekulargenetik (quantitative/nested PCR, Resistenznachweis)

*\*Bei entsprechender Indikation werden die Kosten dieser Untersuchungen von den Krankenkassen übernommen und belasten **nicht** das Budget des einsendenden Arztes (Überweisungsschein mit Ausnahmeindikation 32010).*

### Empfohlene Vorgehensweise bei der Diagnose\*

Methode	Vorteile und Nachteile	Warum?
Chromosomenanalyse (Knochenmark)	Alle Chromosomen können beurteilt werden, teilende Zellen (Metaphasen) müssen untersucht werden.	Ca. 95% der Patienten weisen eine Philadelphia-Translokation auf, ggf. Erfassung von zusätzlichen Chromosomenveränderungen. Ca. 5% der Patienten zeigen einen unauffälligen Chromosomensatz oder eine Variantranslokation. Wichtig ist die Kenntnis des ursprünglichen Karyotyps, da der Übergang von der chronischen Phase der CML zur Blastenkrise von zusätzlichen Chromosomenveränderungen begleitet sein kann.
Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	Teilende (Metaphasen) und nicht teilende Zellen (Interphasekerne) werden mit bestimmten DNA-Sonden untersucht werden. Alle Chromosomenveränderungen werden nicht erfasst.	Bei CML-Patienten mit einem unauffälligen Chromosomensatz oder einer Variantranslokation lässt sich mit der FISH-Technik ein BCR/ABL-Rearrangement nachweisen.
Molekulargenetik PCR ggf. quantitative PCR	Hoch sensitive Methode, Chromosomenveränderungen werden nicht erfasst.	Typisierung und Bestimmung der Ausgangsmenge des BCR/ABL-Transkriptes, wichtig für die Beurteilung des Therapieverlaufs.

### Empfohlene Vorgehensweise für das genetische Monitoring nach Therapiebeginn\*

Methode	Wann?	Sensitivität
Chromosomenanalyse (Knochenmark)	Alle 3 Monate, bis zum Erreichen einer kompletten cytogenetischen Remission, danach alle 6 Monate.  Nachweis von (zusätzlichen) Chromosomenveränderungen (klonale Evolution) bei Philadelphia-Translokation positiver oder Philadelphia-Translokation negativer Hämatopoese.	1 positive Zelle auf 20 analysierte Metaphasen (Sensitivität 5%).  Das Monitoring des cytogenetischen Ansprechens stellt weiterhin den Standard im Rahmen der Verlaufskontrolle unter Therapie dar (Zitat: Hochhaus et al., 2004b).
FISH (Knochenmark/peripheres Blut)  - Interphase-FISH  - Hypermetaphasen (HM)-FISH (nur Knochenmark)	Allgemein: Für Verlaufskontrollen unter Therapie kann die FISH-Technik als Methode zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung verwendet werden.  Alle 3 Monate (bis kein BCR/ABL-Rearrangement mehr nachgewiesen wird), dann alle 6 Monate.  Wenn kein BCR/ABL-Rearrangement mehr mittels Interphase-FISH nachgewiesen wird. Die Sensitivität der Cytogenetik kann durch die HM-FISH insbesondere bei Patienten mit kompletter cytogenetischer Remission gesteigert werden (Schoch et al., 2002).	1 positive Zelle auf 200 analysierte Interphasekerne (Sensitivität 0,5%).  Mittels HM-FISH konnten wir bisher kein BCR/ABL-Rearrangement in Knochenmarkzellen (Normalkontrolle) nachweisen.
Molekulargenetische Therapieverlaufskontrolle quantitative PCR (ggf. nested PCR)(peripheres Blut)	Alle 3 Monate (Beobachtung des weiteren Abfalls bzw. ggf. des Anstiegs des BCR/ABL-Rearrangements).	Bei einem Abfall des BCR/ABL-Transkriptes um mehr als drei Größenordnungen spricht man von einer guten molekularen Remission, (mindestens 3 log oder als Quotient BCR-ABL/ABL = 0,12%), Sensitivität 0,001%.
Molekulargenetischer Resistenznachweis (peripheres Blut)	Wenn keine hämatologische Remission vorliegt bzw. bei Verlust der hämatologischen Remission ggf. wenn kein Abfall des BCR/ABL-Transkriptes um mehr als drei Größenordnungen bzw. wenn ein signifikanter Anstieg des Quotienten BCR-ABL/ABL nachgewiesen wird.	

\*Siehe u.a. Hochhaus et al., 2004a, Dtsch. Med. Wochenschr. 129, 2122-2127; Hochhaus et al., 2004b, Chronische myeloische Leukämie, Uni-Med Verlag AG; Haferlach et al., 2003, Chronische myeloische Leukämie...in Molekularmedizinische Grundlagen ..., Ganten und Ruckpaul (Hrsg.), 249-267; Schoch et al., Leukemia 2002, 53-59.