

Myeloische Leukämien

Christa Fonatsch, Elisabeth Krömer

Institut für Medizinische Biologie,
Wien

Zusammenfassung

Die Bedeutung cytogenetischer und molekulargenetischer Befunde bei myeloischen Leukämien wächst mit Zunahme der Datenfülle; es werden verbindlichere Aussagen, z. B. über den Krankheitsverlauf, möglich. Parallel dazu haben intensivierete Bemühungen, therapeutische Ansätze zu kreieren, die direkt auf den genetischen Defekt abzielen, zur Entwicklung neuer Substanzen, wie des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib bei Leukämien mit Philadelphia-Translokation oder von ATRA bei der akuten Promyelozytenleukämie, geführt. Solche therapeutischen Modalitäten basieren auf cytogenetischen und, in Konsequenz, molekulargenetischen Erkenntnissen, und die zukünftige Aufgabe der Genetikdisziplinen wird es sein, durch Entwicklung und Einsatz verfeinerter Methoden den Einblick in Mechanismen der malignen Transformation und Metastasierung zu erweitern und damit auch einen Beitrag zur Bekämpfung der myeloischen Leukämien zu leisten.

Schlüsselwörter

CML – MDS – AML – Karyotypveränderungen – molekulargenetische Diagnostik – Prognose – Therapie

Summary

The importance of cytogenetic and molecular genetic findings in myeloid leukemias increased with rising knowledge. The identification of specific chromosome anomalies has provided clinicians with important prognostic information. In addition, intensive efforts to create therapeutic schemes directed against specific genetic defects, led to the development of new substances, like the tyrosine kinase inhibitor Imatinib (STI 571) for leukemias with Philadelphia translocation, or of ATRA for acute promyelocytic leukemia. Such therapeutic modalities are based upon cytogenetic and subsequent molecular genetic discoveries. In the future, the tasks of genetic disciplines will be to develop and employ more refined methods in order to gain new insights into the genetic mechanisms of malignant transformation and metastatic invasion, and thus to contribute to the fight against myeloid leukemias.

Keywords:

CML – MDS – AML – karyotype abnormalities – molecular genetic findings – prognosis – therapy planning

Einleitung

Die myeloischen Leukämien umfassen chronische und akute Formen, ferner zählen auch die myelodysplastischen Syndrome dazu. Unter dem Begriff chronisch myeloproliferative Erkrankungen (CMPE) werden die chronisch myeloische Leukämie (CML), die Polycythämia vera (PV), die Osteomyelosklerose/Osteomyelofibrose (OMS/OMF) und die essentielle Thrombocythämie (ET) zusammengefasst.

Die chronisch myeloische Leukämie, die hier stellvertretend für alle CMPE abgehandelt wird, zeichnet sich durch eine hohe Zahl an reifen Granulozyten im peripheren Blut aus. In der chronischen Phase, in der die Krankheit zu meist diagnostiziert wird, ist noch keine Reifungsstörung zu beobachten. Diese tritt erst in der Akzeleration und in der Blastenkrise in Erscheinung. Klinisch zeichnen sich Patienten mit CML oftmals durch Hepato- und Splenomegalie, Neigung zur Thrombose, unklare Thrombocytose, Knochen- und Gelenksschmerzen, auch Müdigkeit, Leistungsabfall, Fieber und Nachtschweiß aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei der CML bei 45-55 Jahren; die Häufigkeit wird mit zwei Neuerkrankten unter 100.000 Einwohnern pro Jahr angegeben.

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind heterogen in ihrem Erscheinungsbild, betreffen aber stets blutbildende Stammzellen und sind mit einer sowohl funktionellen als auch morphologisch gestörten Hämatopoese verbunden. Im peripheren Blut

Tab 1 Die WHO-Klassifikation der myeloischen Neoplasien

Chronische myeloproliferative Erkrankungen (CMPE)

- Chronische myeloische Leukämie (CML), Philadelphia-Chromosom-positiv
- Polycythämia vera (PV)
- Osteomyeloklerose/Osteomyelofibrose (OMS/OMF)
- Essentielle Thrombocythämie (ET)

Myelodysplastische/myeloproliferative Erkrankungen

- Chronische myelomonocytäre Leukämie (CMML)
- Juvenile myelomonocytäre Leukämie (JMML)
- Atypische chronische myeloische Leukämie (aCML)

Myelodysplastische Syndrome (MDS)

- Refraktäre Anämie (RA)
- RA mit Ringsideroblasten (RARS)
- Refraktäre Cytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)
- RA mit Blastenbildung (RAEB)
- 5q- -Syndrom
- MDS, unklassifizierbar

Akute myeloische Leukämien (AML)

AML mit spezifischen cytogenetischen Veränderungen

- AML mit t(8;21)(q22;q22)
- Akute Promyelocytenleukämie [t(15;17)(q22;q21)]
- AML mit abnormen Eosinophilen [inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22)]
- AML mit 11q23-Aberrationen

AML mit multilineärer Dysplasie

- Mit MDS-Vorstadium
- Ohne MDS-Vorstadium

AML und MDS sekundär (therapieinduziert)

AML ohne weitere Kategorisierung

Akute biphänotypische Leukämien

Aus Harris et al. 1999

lassen sich Anämie und/oder Leukocytopenie und/oder Thrombocytopenie nachweisen. Die Funktionsstörung kann alle drei Zellreihen betreffen. Myelodysplastische Syndrome wurden früher als Präleukämien bezeichnet, da etwa 40-50% in eine akute Leukämie übergehen können. Die Einteilung der myelodysplastischen Syndrome erfolgte auf der Basis von cytomorphologischen Merkmalen und hat zu einer reproduzierbaren Klassifikation (FAB-Klassifikation, da französische, amerikanische und britische Hämatologen und Pathologen erarbeitet haben) geführt. Kürzlich wurde von der WHO eine neue Klassifikation vorgeschlagen, die die FAB-Klassifikation weiterentwickelt (1999) (Tab.1).

Neben de novo myelodysplastischen Syndromen werden sekundäre MDS beobachtet, die entweder im Rahmen einer genetisch bedingten Disposition, wie den Chromosomenbruchsyndromen Bloom-Syndrom und Fanconi-Anämie, oder der Neurofibromatose Typ 1, auftreten oder auf eine Exposition an mutagene/karzinogene Substanzen zurückzuführen sind, wie z.B. ionisierende Strahlen, Benzol, Pestizide u.a. oder auch auf Cytostatika oder Strahlen, die in der Therapie eines vorangegangenen Malignoms eingesetzt wurden. Klinisch werden

beim MDS keine für diesen Krankheitstyp charakteristischen Befunde erhoben; die Patienten leiden an Infektionen, zeigen öfter eine Neigung, blaue Flecken zu entwickeln, sind meist anämisch, matt und abgeschlagen. Bei myelodysplastischen Syndromen liegt das mediane Erkrankungsalter zwischen 58 und 74 Jahren, allerdings treten MDS zunehmend auch bei jüngeren Patienten auf. Spezifische Formen des MDS werden auch im frühen Kindesalter beobachtet. Die Inzidenz pro Jahr und 100.000 Einwohnern liegt bei Patienten über 70 Jahren zwischen 15 und 89, bei Patienten von 50 bis 69 Jahren zwischen 1,6 und 15 und bei Patienten unter 49 Jahren bei 0,2 bis 0,7.

Die akute myeloische Leukämie (AML) zeichnet sich durch eine exzessive Anhäufung von unreifen, nicht-lymphatischen Knochenmark-Vorläuferzellen (Blasten) im Knochenmark selbst, im peripheren Blut und manchmal auch in anderen Geweben aus. Dies beruht entweder auf einer erhöhten Proliferationsaktivität oder reduziertem Zelltod. Ein Reifungsblock verhindert, dass die Zellen einen der vier Hauptdifferenzierungswege für myeloische Zellen durchschreiten, der zu ausgereiften Granulozyten, Monocyten, Erythrocyten

oder Megakaryocyten führt. Wie bei den myelodysplastischen Syndromen werden de novo AML den sekundären AML, die auf äußere mutagene Einflüsse physikalischer oder chemischer Natur zurückzuführen sind, oder sich aus einem vorangegangenen myelodysplastischen Syndrom entwickeln, gegenübergestellt. Entsprechend dem Differenzierungsweg und dem Grad der Reifung, den die leukämischen Zellen zeigen, werden neun Gruppen von akuten myeloischen Leukämien morphologisch unterschieden (FAB-Klassifikation). Neuerdings werden zur Diagnosestellung der AML-Subtypen neben morphologischen auch immunologische, cytogenetische und molekulargenetische Befunde miteinbezogen. Die WHO hat, wie für myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome, auch für die AML eine neue Klassifikation vorgestellt (1999) (Tab.1).

Die klinischen Symptome der AML können unterschiedlich sein, jedoch sind sie für gewöhnlich direkt auf die leukämische Infiltration des Knochenmarks mit daraus resultierender Cytopenie zurückzuführen. Die Patienten zeichnen sich durch Müdigkeit, Hämmorrhagien, Infektionen und Fieber als Folge der Abnahme der Erythrocyten, der Thrombocyten oder der weißen Blutkörperchen aus. Andere Symptome werden durch die leukämische Infiltration, z. B. der Leber (Hepatomegalie), der Milz (Splénomegalie), der Haut, der Lymphknoten, der Knochen und des Zentralnervensystems, hervorgerufen. Manche Patienten zeigen auffallende Blässe und

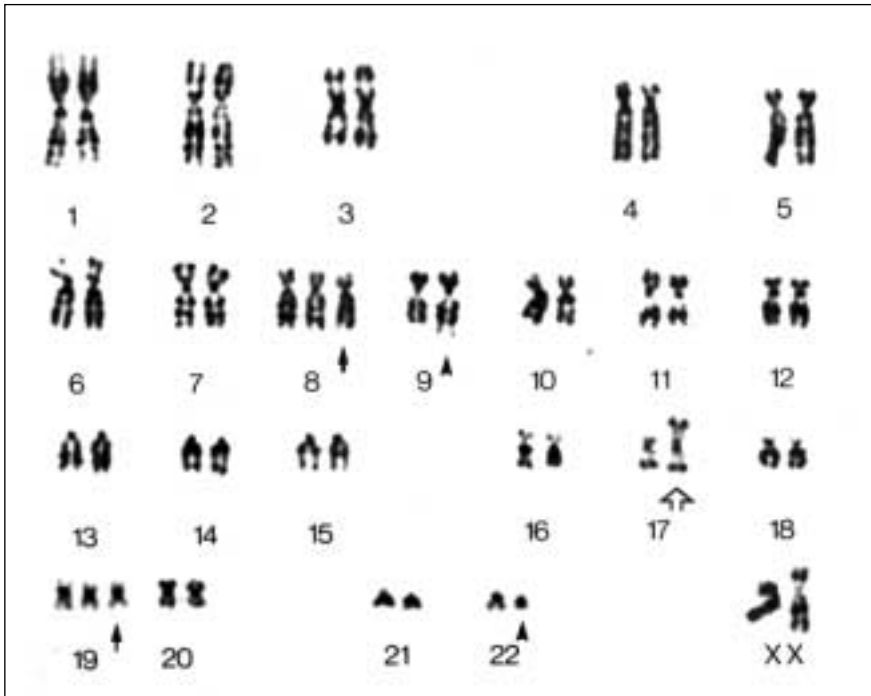


Abb 1 Giemsa-Banden-Karyogramm aus einer Knochenmarkszelle einer Patientin mit CML in der Blastenkrise

Neben der Philadelphia-Translokation (Pfeilköpfe) finden sich je ein überzähliges Chromosom 8 und 19 (gestielte Pfeile), sowie ein Isochromosom der langen Arme von Chromosom 17 (offener Pfeil).

Müdigkeit, sowie Atemnot bei Belastung.

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters, der Median liegt bei 55-60 Jahren, die Häufigkeit ist mit 2,4 bis 4 neu erkrankten Patienten von 100.000 Einwohnern pro Jahr zu beziffern. AML kann auch im Kindesalter auftreten.

Zentrale Fragestellung

Historisch gesehen spielt bei der Diagnose von myeloischen Leukämien die Morphologie eine dominierende Rolle. Sowohl für die Klassifikation von myelodysplastischen Syndromen als auch von akuten myeloischen Leukämien bildet die Einteilung nach morphologischen Kriterien (FAB-Klassifikationen) die Grundlage.

Die FAB-Klassifikation beruht auf morphologischen und cytochemischen Blastzellcharakteristika. Auch die kürzlich von der World Health Organization (WHO) vorgeschlagene Neuklassifizierung behält die FAB-Subtypen bei, bezieht aber spezifische Chromosomenveränderungen und damit verbundene molekulargenetische Umlagerungen in die Charakterisierung, z. B. der AMLs, mit ein (Tab.1).

Die cytogenetische bzw. molekulargenetische Analyse spielt jedoch keineswegs nur bei der Diagnose und Feststellung des Subtyps einer Leukämie oder eines myelodysplastischen Syndroms eine entscheidende Rolle, sondern ist auch nützlich für

die Stadienfestlegung, z. B. für die Früherkennung einer herannahenden Blastenkrise bei der CML. Vor allem aber sind diese Ergebnisse für die Prognose von eminenter Bedeutung. Aufgrund der Aussagekraft des cytogenetischen und/oder molekulargenetischen Befundes, den Krankheitsverlauf und das Ansprechen auf Therapie betreffend, finden die genetischen Daten auch Eingang in die Planung von Behandlungsschemata. Chromosomenanalysen und molekulargenetische Untersuchungen dienen aber auch der Verlaufskontrolle, der Erfassung der minimalen Resterkrankung, der Remissionsüberprüfung und der Erfassung von Rezidiven.

Zytogenetische und molekulargenetische Befunde

Spezifische chromosomale und/oder molekulare Veränderungen bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML)

Die Geburtsstunde der Tumorzytogenetik lag mit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms im Jahr 1960. Nowell und Hungerford wiesen im Knochenmark von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) ein kleines, wie sie meinten deletiertes, Chromosom nach. Rowley (1973) konnte jedoch zeigen, dass es sich bei dem Philadelphia-Chromosom nicht um eine Deletion, sondern um einen Partner einer Translokation handelt – das am Chromosom 22 fehlende Stück ist an den langen Arm von Chromosom 9 verlagert. Diese bahnbrechende Aufklärung der Philadelphia-Translokation war durch den

Einsatz von Chromosomen-Bänderungstechniken möglich. Schließlich führte die Entwicklung molekulargenetischer Methoden zur Identifizierung der von der Translokation betroffenen Gene: In der Chromosomenbande 9q34 liegt das *ABL*-Onkogen, in der Chromosomenbande 22q11 das *BCR*-Gen (breakpoint cluster region; Groffen et al., 1984). Die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ lässt auf dem Derivatvchromosom 22 ein hybrides *BCR-ABL*-Gen und auf dem Derivatvchromosom 9 ein Fusionsgen *ABL-BCR* entstehen. Für die Ausprägung der CML ist das *BCR-ABL*-Fusionsgen, bzw. das chimäre Genprodukt, eine Tyrosinkinase, verantwortlich. 95 % der Patienten mit CML weisen eine Philadelphia-Translokation in ihren Knochenmarkszellen auf; davon zeigen wiederum 2-8% variante Philadelphia-Translokationen, bei denen cytogenetisch neben dem Chromosom 22 ein anderes als Chromosom 9 als Partner beteiligt ist (einfach variant) oder in die neben 9 und 22 ein oder mehrere weitere Chromosomen involviert sind (komplex variant). Molekulargenetisch ist auch bei den einfach varianten Translokationen die Beteiligung von Chromosom 9, bzw. des *ABL*-Onkogens, am Rearrangement nachweisbar. Die Translokation des *ABL*-Gens auf das Derivatvchromosom 22 kann auch mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) demonstriert werden. Etwa 5% aller CML-Patienten zeigen ein Normalkaryotyp in ihren Knochenmarkszellen, jedoch lässt sich auch hier mittels FISH oder RT-PCR ein *BCR-ABL*-Rearrangement, offenbar

Tab 2 Cytogenetische und molekulargenetische Anomalien bei AML und MDS

Typ der Chromosomen-Anomalie	Involvierte Gene	Tritt auf bei
t(1;3)(p36;q21)	<i>MEL1</i> ; ?	AML/(MDS)
+1q	?	MDS
der(1)t(1;7)(q10;p10)	?	AML/(MDS)
t(1;11)(q21;q23)	<i>AF4</i> ; <i>MLL</i>	AML
t(1;22)(p13;q13)	<i>OTT</i> ; <i>MAL</i>	AML
inv(3)(q21q26),t(3;3)(q21;q26)	?	AML/MDS
t(3;5)(q25.1;q34)	<i>MLF1</i> ; <i>NPM</i>	AML
t(3;21)(q26;q22)	<i>EVI1/EAP/MDS1</i> ; <i>AML1</i>	AML/(MDS)
+4(±dmin)	? (<i>CMYC</i>)	AML
-5/del(5q)	?	AML/MDS
t(5;11)(q35;p15)	<i>NSD1</i> ; <i>NUP98</i>	AML
t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB</i> ; <i>ETV6/TEL</i>	MDS
t(6;9)(p23;q34)	<i>CAN</i> ; <i>DEK</i>	AML/MDS
t(6;11)(q27;q23)	<i>AF6</i> ; <i>MLL</i>	AML
t(7;11)(p15;p15)	<i>HOXA9</i> ; <i>NUP98</i>	AML
-7/del(7q)	?	AML/MDS
+8	?	AML/MDS
t(8;16)(p11;p13)	<i>MOZ</i> ; <i>CBP</i>	AML
t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO</i> ; <i>AML1</i>	AML
+9	?	AML/MDS
t(9;11)(p22;p15)	<i>LEDGF</i> ; <i>NUP98</i>	AML
t(9;11)(p23;q23)	<i>AF9</i> ; <i>MLL</i>	AML
del(9q)	?	AML
t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL</i> ; <i>BCR</i>	AML/(MDS)
t(10;11)(p13;q14)	<i>AF10</i> ; <i>CALM</i>	AML
t(10;11)(p12;q23)	<i>AF10</i> ; <i>MLL</i>	AML
+11	<i>MLL</i> ?	AML/MDS
t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL</i> ; <i>AF17</i>	AML
t(11;17)(q23;q21)	<i>PLZF</i> ; <i>RARA</i>	AML
t(11;17)(q23;q25)	<i>MLL</i> ; <i>MSF</i>	AML/MDS
t(11;19)(q23;p13.1)	<i>MLL</i> ; <i>ELL</i>	AML
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL</i> ; <i>ENL</i>	AML
t/del(11q23)	<i>MLL</i>	AML/(MDS)
t/del(12p)	<i>ETV6/TEL</i>	AML/MDS
del(13q)	?	MDS
+13	?	AML/MDS
+14	?	AML/MDS
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML</i> ; <i>RARA</i>	AML
inv(16)(p13q22),t(16;16)(p13;q22)	<i>MYH11</i> ; <i>CBFB</i>	AML/(MDS)
t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS</i> ; <i>ERG</i>	AML
i(17)(q10), del(17p)	<i>TP53</i> ?	AML/MDS
-18/del(18q)	?	MDS
+19	?	MDS
del(20q)	?	AML/MDS
+21	?	AML/MDS
-X,-Y	?	AML/MDS
Normal-Karyotyp		AML/MDS

Zusammengestellt aus:

Heim u. Mitelman 1995, Grimwade et al. 1998, Kelly et al. 2002, eigene Beobachtungen

als Folge einer submikroskopischen Insertion, erkennen. Diese Form der CML wird als Philadelphia-negativ, aber *BCR-ABL*-positiv bezeichnet.

Zusätzlich zur Philadelphia-Translokation können schon bei Erstdiagnose oder während des Krankheitsverlaufs weitere spezifische Chromosomenanomalien, wie zum Beispiel überzählige Chromosomen 8, 19, auch ein zusätzliches Derivatvchromosom 22 oder ein Isochromosom der langen Arme von Chromosom 17, auftreten (Abb.1). Wenn ursprünglich nur die Philadelphia-translokation vorhanden war, deuten neu erworbene, sekundäre Chromosomenanomalien auf das Herannahen einer Blastenkrise hin und sind somit von prognostischer Bedeutung. Im Rahmen der Krankheitsprogression treten bei 75-85%

der Patienten solche zusätzlichen Karyotypveränderungen auf, während nur 10-20% der Patienten bereits in der chronischen Phase sekundäre Chromosomenanomalien zeigen.

Kürzlich konnte mittels FISH-Analyse nachgewiesen werden, dass bei einer Reihe von Patienten (15%) große Deletionen am Derivatvchromosom 9 auftreten und dass dieser Befund mit einer deutlich schlechteren Prognose korreliert (Huntly et al., 2001).

Zur Bestätigung der (Verdachts-)Diagnose CML wird eine klassische Chromosomenbänderungsanalyse durchgeführt, um die klassische von einer varianten Philadelphia-translokation zu unterscheiden und eventuelle zusätzliche Anomalien zu erfassen. Eine FISH-Analyse ermöglicht den Nach-

weis der prognostisch ungünstigen Deletion auf dem Derivatvchromosom 9; eine *BCR-ABL*-spezifische RT-PCR ist vor allem auch als Basis für Verlaufsuntersuchungen unter Therapie zu empfehlen.

In diesem Zusammenhang ist eine neue, maßgeschneiderte Therapie zu erwähnen, die sich gegen das von dem *BCR-ABL*-Fusionsgen gebildete chimäre Protein, eine Tyrosinkinase, richtet. Diese, als STI 571 oder Glivec oder Imatinib bezeichnete Substanz, ein Tyrosinkinaseinhibitor, ist zur Zeit weltweit in Erprobung. Allerdings gibt es inzwischen erste Berichte über eine Resistenzentwicklung gegenüber dieser Therapie, die auf Punktmutationen im *BCR-ABL*-Fusionsgen oder auf eine erhöhte *BCR-ABL*-Expression infolge einer Amplifikation des *BCR-ABL*-Gens zurückgeführt wird (Gorre et al., 2001).

Bevor die CML von der chronischen Phase in die Blastenkrise übergeht, sind oftmals, wie erwähnt, zusätzliche Chromosomenanomalien zu erkennen. Aber es treten auch molekulare Zusatzveränderungen in Form von Mutationen in Zellzyklusgenen, wie zum Beispiel in *Rb1*, oder in Tumorsuppressorgenen, wie *p16* oder *p15*, auf; besonders häufig werden Deletionen und Mutationen des *p53*-Gens beobachtet.

Spezifische cytogenetische und molekulargenetische Befunde bei myelodysplastischen Syndromen (MDS)

Wie in Tabelle 2 ausgeführt, treten die meisten Karyotyp-Veränderungen, die bei MDS beobachtet werden, auch bei der akuten myeloischen Leukämie auf. Unterschiede bestehen allerdings darin, dass es bei MDS-Patienten sehr häufig zum Verlust von ganzen oder von Teilen von Chromosomen kommt, während bei de novo AML balancierte Translokationen, seltener Inversionen im Vordergrund stehen.

Eine besonders häufige Strukturaberration bei MDS ist der isoliert auftretende Verlust eines Stückes des langen Armes von Chromosom 5, der dem sog. 5q--Syndrom zugrunde-

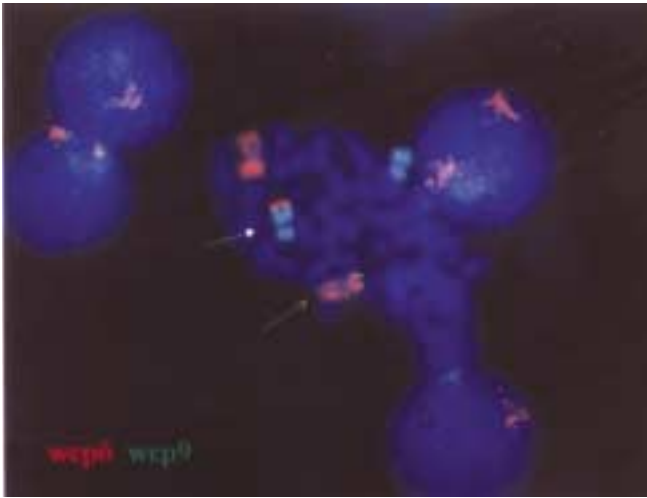


Abb 2 Knochenmarkmetaphasen nach FISH mit Paintingsonden für die Chromosomen 6 und 9

Die Pfeile weisen auf die Derivat-chromosomen der(9) (grün) und der(6) (rot), die aus der Translokation t(6;9)(p23;q34) hervorgegangen sind.

liegt. Deletionen des langen Armes von Chromosom 5 werden bei 15-20% der Patienten, partielle und totale Monosomien 7 bei 10-15% und die Trisomie 8 bei ebenfalls 10-15% der Patienten nachgewiesen. Je 5% der Patienten zeigen eine (partielle) Trisomie 1q, eine (partielle) Monosomie 20, eine Trisomie 21, 12p-Anomalien und eine (partielle) Monosomie 18. Selten (bei 3-5%) werden 3q- und 17p-Anomalien, sowie eine Trisomie 11 und eine Trisomie 13 beschrieben. Relativ häufig (bis 15-20% der Patienten) wird ein komplex aberranter Karyotyp nachgewiesen, das heißt das Vorhandensein von mindestens 3 Chromosomenanomalien pro Zelle.

Der cytogenetische Befund stellt einen wichtigen, weil unabhängigen prognostischen Faktor bei myelodysplastischen Syndromen dar, zum Beispiel ist ein komplex aberranter Karyotyp mit einer besonders ungünstigen Prognose vergesellschaftet (Tab.3), während das isolierte Auftreten einer 5q-Deletion als eher günstiger prognostischer Parameter gilt. Oftmals werden bei Patienten mit MDS cytogenetische Veränderungen im Sinne einer Karyotypevolution beobachtet, die mit dem Übergang in eine akute myeloische Leukämie assoziiert sein kann.

Auf dem langen Arm von Chromosom 5 ist eine Fülle von Genen für hämatopoetische Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, sowie für die Regulation des Zellzyklus und der DNA-Reparatur lokalisiert. Die für das 5q--Syndrom kritische Region wurde auf

die Bande 5q31 eingeengt, jedoch sind die/das maßgebliche(n) Gen(e) noch nicht identifiziert. Zwei neue Gene – *C5orf3* und *C5orf4* – wurden kloniert und werden, neben weiteren Kandidaten-Sequenzen, eingehenden Prüfungen unterzogen (Boulwood et al., 2000, Horrigan et al., 2000).

Die häufig bei MDS zu beobachtende Monosomie 7, die besonders oft bei Therapie-induzierten MDS und AML auftritt, ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Wie bei der 5q-Deletion konnte auch bei der partiellen Monosomie 7 der kritische, also der in der Mehrzahl der Fälle deletierte Bereich, eingegrenzt werden. Allerdings sind auf dem langen Arm von Chromosom 7 zwei Abschnitte, einerseits die Bande 7q22 und andererseits der Bereich 7q32–33, signifikant von Verlusten betroffen. Obwohl eine Reihe von „Kandidaten“-Genen, die auf 7q lokalisiert sind, hinsichtlich ihrer Funktion als die relevanten Tumorsuppressorgene untersucht wurden, sind die kritischen Gene noch nicht identifiziert.

Die Trisomie 8 ist nach der 5q-Aberation bei MDS die häufigste Karyotypabweichung. Liegt die Trisomie 8 als alleinige Chromosomenanomalie vor, so ist sie mit einer intermediären Prognose verbunden. Die molekulargenetische Bedeutung der Trisomie 8 ist bisher ungeklärt.

Die für einen Subtyp der MDS, die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), charakteristische Translokation t(5;12)(q33;p13) führt zur Bil-

dung eines spezifischen Fusionsgens, bestehend aus Sequenzen des *ETV6/TEL*-Gens (12p13) und des *PDGFRβ*-Gens (platelet derived growth factor receptor β). Das *PDGFRβ*-Gen codiert eine Rezeptortyrosinkinase, *ETV6/TEL* einen Transkriptionsfaktor; die Funktion des Fusionsgens und seines Produktes ist nicht vollständig geklärt.

Etwa 40-60% der Patienten mit MDS zeigen einen Normalkaryotyp im Knochenmark, allerdings ist dieser keineswegs stets mit einer guten Prognose assoziiert, denn 25% dieser Patienten versterben innerhalb eines Jahres nach Chromosomenanalyse. Ob bei diesen Patienten spezifische molekulargenetische Veränderungen, zum Beispiel Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *p15*, eine Rolle spielen, wird zu klären sein.

Ein Gen, das offenbar eine Aggravierung des Krankheitsverlaufes bewirkt, ist das *p53*-Tumorsuppressorgen, das bei 5-10% der Patienten im fortgeschrittenen Stadium Mutationen aufweist.

Charakteristische cytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bei akuten myeloischen Leukämien (AML)

Die klassische Chromosomenbänderungsanalyse, ergänzt durch verschiedene Verfahren der molekularen Cytogenetik, wie Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung, vergleichende Genomhybridisierung (= comparative genomic hybridisation = CGH) und Mehrfarben-FISH, sind bei der Diagnose der

Tab 3 Prognostisch relevante cytogenetische Kategorien bei AML und MDS

Typ der Chromosomen-Anomalie	Tritt auf bei	Prognose
t(8;21)(q22;q22)	AML	günstig
t(15;17)(q22;q21)	AML	günstig
inv(16)(p13q22),t(16;16)(p13;q22)	AML/(MDS)	günstig
del(5q)	MDS	günstig
Normal-Karyotyp	AML/MDS	intermediär
+8	AML/MDS	intermediär
t(9;11)(p21~22;q23)	AML	intermediär
t/del(12p)	AML/MDS	intermediär/ungünstig
der(1)t(1;7)(q10;p10)	AML/(MDS)	ungünstig
inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)	AML/MDS	ungünstig
-5/del(5q)	AML	ungünstig
t(6;9)(p23;q34)	AML/MDS	ungünstig
-7/del(7q)	AML/MDS	ungünstig
t(9;22)(q34;q11)	AML/(MDS)	ungünstig
t/del(11q23)	AML/(MDS)	ungünstig
komplex aberrant	AML/MDS	ungünstig

akuten myeloischen Leukämie von entscheidender Bedeutung, da dem cytogenetischen Befund eine von anderen Risikofaktoren unabhängige prognostische Rolle zukommt. Vergleichbar wichtig sind molekulargenetische Untersuchungen, die ebenfalls bei der Diagnosestellung einer AML obligat durchzuführen sind. Die bei der AML erhobenen genetischen Daten dienen der Vorhersage des Krankheitsverlaufes und des Ansprechens auf die Therapie und lassen Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission, sowie die Dauer des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens zu.

Wie bereits bei CML und MDS erwähnt, werden auch bei den akuten myeloischen Leukämien primäre von sekundären Chromosomenanomalien unterschieden. Die primären Anomalien treten zuerst auf, sind für die Krankheitsentstehung und den histologischen Subtyp (mit)verantwortlich; zumeist handelt es sich um balancierte Translokationen oder Inversionen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen führen (Tabelle 2). Sekundäre Chromosomenanomalien sind mit der Progression des Krankheitsverlaufes, auch mit dem Resistentwerden gegenüber Therapien verknüpft; häufig werden Verluste und Zugewinne von Chromosomensegmenten und somit der Verlust von Tumorsuppressorgenen beobachtet.

Cytogenetische und molekulargenetische Befunde sind – wie bei CML und MDS – auch bei den akuten myeloischen Leukämien sowohl von klini-

scher als auch von wissenschaftlicher Relevanz:

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer AML kann durch die Aufdeckung spezifischer klonaler Chromosomenanomalien die Verdachtsdiagnose erhärtet und ein Hinweis auf den AML-Subtyp gewonnen werden. Für die AML charakteristische und wohl etablierte numerische und strukturelle Chromosomenanomalien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Hervorzuheben sind die mit einer günstigeren Prognose vergesellschafteten Translokationen t(8;21)(q22;q22) und t(15;17)(q22;q21), sowie die perizentrische Inversion inv(16)(p13q22). Diesen Chromosomenanomalien steht die Gruppe der Karyotypabweichungen, die ein schlechtes Ansprechen auf Therapie signalisieren, gegenüber. Dazu zählen partielle und totale Monosomien 5 und 7, 11q23-Anomalien, 3q-Aberrationen und komplexe cytogenetische Veränderungen. Auch die Translokation t(6;9)(p23;q34) (Abb.2), die vor allem bei akuten myeloischen Leukämien der FAB-Subtypen M2 und M4 beobachtet wird, geht mit einer schlechten Prognose einher. Der FAB-Subtyp M2 ist andererseits häufig mit der prognostisch günstigen Translokation t(8;21) assoziiert; daher ist eine Chromosomenanalyse bei Diagnosestellung zur Vorhersage des Krankheitsverlaufes von größter Wichtigkeit (Tab.3).

Für viele der primären Chromosomenanomalien bei der AML ist ihre prognostische Wertigkeit bekannt; neben den drei mit „günstigerer“ Prognose

vergesellschafteten Strukturaberrationen und den erwähnten ungünstigen cytogenetischen Parametern ist jedoch die große Gruppe der Patienten mit Normalkaryotyp und mit Chromosomenanomalien, deren prognostische Bedeutung noch unklar ist, zu beachten.

Die Rolle der sekundären Chromosomenanomalien ist noch nicht völlig geklärt; es scheint so, als ob Zusatzaberrationen bei t(8;21), t(15;17) und inv(16) keine Verschlechterung des Krankheitsverlaufes indizieren.

Besondere Bedeutung kommt dem cytogenetischen Befund bei der Wahl der Therapie zu. Dies ist besonders eindrucksvoll an der akuten Promyelozytenleukämie (APL) mit Translokation t(15;17) zu demonstrieren. Bei dieser Translokation kommt es zur Bildung eines hybriden Gens aus Sequenzen des in 17q21 gelegenen *RAR α* (Retinsäurerezeptor- α)-Gens und des in 15q22 lokalisierten *PML* (Promyelozyten-Leukämie)-Gens (Abb. 3). Das *PML-RAR α* -Rearrangement hat die Bildung eines nicht funktionsfähigen Retinsäurerezeptor- α zur Folge. Dieser kann durch ein Überangebot von all-trans-Retinsäure (ATRA) überlistet werden, und damit lassen sich die in ihrer Reifung blockierten Promyelozyten zur Differenzierung in Granulozyten anregen. Die ATRA-Therapie ist somit eine auf den genetischen Defekt maßgeschneiderte Therapie, die seit einigen Jahren in Kombination mit Anthracyclinen bei Patienten mit APL erfolgreich eingesetzt wird. Das Ansprechen auf die Thera-



Abb 3 Knochenmarkinterphase nach FISH mit DNA-Sonden für die Gene *PML* (15q22) und *RARA* (17q21) eines Patienten mit akuter Promyelocytenleukämie
Der Pfeil weist auf das Fusionssignal *PML-RARA*.

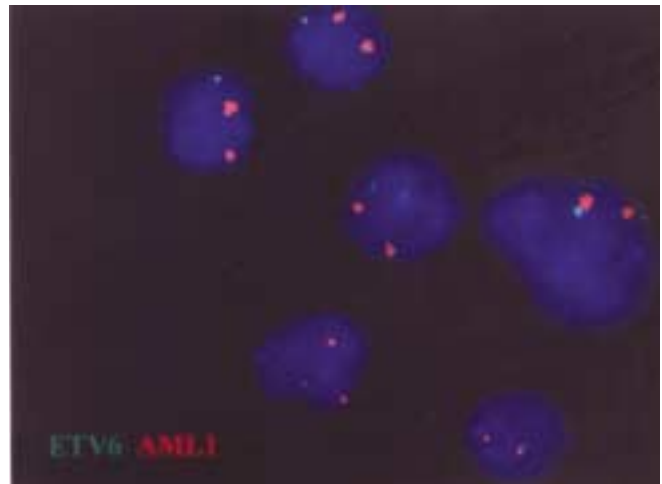


Abb 4 Interphasen aus Knochenmark eines Patienten mit MDS nach FISH mit DNA-Sonden, die die Gene *ETV6/TEL* (12p13) und *AML1* (21q22) enthalten
In vier der fünf Interphasen sind deutlich zwei rote *AML1*-, aber nur ein grünes *ETV6*-Signal zu erkennen.

pie kann, wie bei anderen AML-Subtypen auch, mittels RT-PCR, aber auch mittels FISH-Analyse unter Verwendung von zum Beispiel Cosmidsonden, die die Gene *PML* und *RAR α* enthalten, geprüft werden (Abb.3).

Dies bedeutet, dass cytogenetische und molekulargenetische Verfahren wertvolle Dienste bei der Remissionsüberwachung und bei der Aufdeckung eines herannahenden Rezidivs leisten. Vor allem die RT-PCR, und hier die neueren quantitativen Formen der Realtime-PCR, spielen bei der Untersuchung der minimalen Restkrankung (minimal residual disease =MRD) eine gewichtige Rolle.

Zu den molekularen Rearrangements, die routinemäßig bei Erstdiagnose einer AML und unter Therapie mittels RT-PCR untersucht werden, gehört z. B. die der Translokation t(8;21)(q22;q22) zugrundeliegende *AML1-ETO*-Umlagerung. Die Translokation hat eine Fusion des *AML1(CBF α)*-Gens, das in 21q22 lokalisiert ist, mit dem *ETO* (eight twenty one)-Gen in Chromosomenbande 8q22 zur Folge. Das *AML1-ETO*-Fusionsprotein hemmt die Aktivierung der Transkription durch das *AML1/CBF α* -Wildtyp-Protein. *CBF α* bildet mit *CBF β* einen heterodimeren *CBF*-Transkriptionskomplex. Das *CBF β* -Gen, in 16q22 lokalisiert, wird in Folge der inv(16)(p13q22) mit dem *MYH11*-Gen (16p13) fusioniert. Auch das *CBF β -MYH11*-Fusionsprotein dürfte den *CBF*-Transkriptionsfaktor inhibieren.

Von großer Wichtigkeit sind die molekularen Umlagerungen des in 11q23 lokalisierten *MLL*-Gens. Bisher sind 54 chromosomale Bruchpunkte bekannt, die in Translokationen mit 11q23 involviert sind; 31 verschiedene Partnergene von *MLL* wurden bereits identifiziert. Die Bezeichnung *MLL* steht für „myeloid-lymphoid leukemia“ oder „mixed lineage leukemia“, da dieses Gen sowohl bei der akuten lymphatischen Leukämie als auch bei der de novo AML und der sekundären AML nach Behandlung mit Topoisomerase II -Inhibitoren und bei biphänotypischen Leukämien an Translokationen und Duplikationen, seltener an Inversionen und Amplifikationen beteiligt ist.

Eine besondere Rolle spielt auch das in 12p13 lokalisierte *TEL/ETV6*-Gen, das sowohl bei MDS als auch bei AML von Deletionen oder Translokationen betroffen sein kann und ebenfalls eine Reihe verschiedener Fusionspartnergene aufweist (Abb.4).

Neben der bei AML und MDS auftretenden Translokation t(7;11)(p15;p15), von der die Gene *HOXA9* und *NUP98* betroffen sind, wurden weitere *NUP98*-Rearrangements in jüngster Zeit aufgedeckt und molekulargenetisch identifiziert: zum Beispiel die t(5;11)(q35;p15) und die t(9;11)(p22;p15), die zur Fusion von *NUP98* mit *NSD1* bzw. mit *LEDGF* führen und somit die Liste der Fusionsproteine, die Komponenten der Kernporen betreffen, erweitern (Kelly et al., 2002).

Besonderer Erwähnung bedürfen die Fälle von AML mit Normalkaryotyp, bei denen submikroskopische Genmutationen in Form von internen Tandemduplikationen des *MLL*-Gens (Schnittger et al., 2000) oder auch des *FLT3*-Gens (Kottaridis et al., 2001) beobachtet werden. Gerade die relativ hohe Inzidenz der *FLT3*-Mutationen (bei 23-27% aller AML-Patienten) ist von besonderer Bedeutung, da sie mit einer eher ungünstigen Prognose einhergeht und häufig bei Patienten mit Normalkaryotyp im Knochenmark zu beobachten ist. Seltener als die *FLT3*- und *MLL*-Duplikationen werden Punktmutationen in den Genen *AML1*, *NRAS*, *KRAS*, *PU1* und *cKIT* gefunden.

Diskussion und Ausblicke

Die Aufdeckung und Identifizierung spezifischer, vor allem struktureller Chromosomenanomalien hat wertvolle Beiträge zur Isolierung und Charakterisierung relevanter Gene geleistet. Denn die Klonierung der Gene *BCR* und *ABL* bei der Philadelphia-Translokation, der Gene *ETO* und *AML1* bei der 8;21-Translokation, sowie des *MLL*-Gens bei diversen 11q23-Rearrangements und vieler anderer Gene, die in spezifische Chromosomenumlagerungen bei myeloischen Leukämien involviert sind, basiert auf dem Kenntnis der Chromosomenbruchpunkte, die den charakteristischen Translokationen und Inversionen zugrundeliegen. Neben dieser enormen Bedeutung der Chromosomenanalyse für die Grundlagenforschung sind cytogenetische Befunde wichtig, um Rückschlüsse auf Entstehungsme-

chanismen von Chromosomenanomalien bzw. molekulargenetischen Umlagerungen ziehen zu können. Hier ist die Assoziation zwischen Therapie mit Topoisomerase II -Blockern und Anthracyclinen und dem Auftreten von balancierten Translokationen, oftmals unter Involvierung der Chromosomenbande 11q32, zu erwähnen und der Induktion von unbalancierten Chromosomenanomalien, z. B. dem totalen oder partiellen Verlust der Chromosomen 5 und/oder 7, durch Behandlung mit alkylierenden Substanzen gegenüberzustellen. Besonders hervorzuheben aber ist die bereits erwähnte Bedeutung des cytogenetischen und des molekulargenetischen Befundes für die Diagnosestellung, die Stadieneinteilung, die Prognose und Therapieplanung. Von klinischer Relevanz ist die Möglichkeit, mittels cytogenetischer und molekulargenetischer Verfahren das Ansprechen auf Therapie zu prüfen, die Remission zu überwachen und das Herannahen eines Rezidivs zu erfassen, sowie die minimale Resterkrankung im Krankheitsverlauf zu beobachten.

Literatur

- Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Kostrzewa M, Jaju RJ, Müller U, Wainscoat JS (2000) Transcription mapping of the 5q- syndrome critical region: cloning of two novel genes and sequencing, expression, and mapping of a further six novel cDNAs. *Genomics* 66: 26-34.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by *BCR-ABL* gene mutation or amplification. *Science* 293: 876-880.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1.612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 92: 2322-2333.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr*, on chromosome 22. *Cell* 36: 93-99.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17: 3835-3849.
- Heim S, Mitelman F (1995) *Cancer Cytogenetics* (2nd ed). Wiley-Liss, New York.
- Horrigan SK, Arbieva ZH, Xie HY, Kravarsic J, Fulton NC, Naik H, Le TT, Westbrook CA (2000) Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood* 95: 2372-2377.
- Huntly BJP, Reid AG, Bench AJ, Campbell LJ, Telford N, Shepherd P, Szer J, Prince HM, Turner P, Grace C, Nacheva EP, Green AR (2001) Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia. *Blood* 98: 1732-1738.
- Kelly L, Clark J, Gilliland DG (2002) Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol* 14: 10-18.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, Walker H, Wheatley K, Bowen DT, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC (2001) The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98: 1752-1759.
- Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293
- Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C, Heinecke A, Haase D, Haferlach T, Büchner T, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F (2000) Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 14: 796-804

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Christa Fonatsch
 Institut für Medizinische Biologie
 Universität Wien
 Währingerstraße 10
 A-1090 Wien
 Tel. 0043-1-4277-60601 Fax 0043-1-4277-9606
 christa.fonatsch@univie.ac.at

Anzeige