



Chronische myeloische Leukämie (CML)

Diagnostische Empfehlung

Methode	Antikoagulans	Empfehlung
Zytomorphologie	EDTA	obligat
Immunphänotypisierung	Heparin	obligat
Chromosomenanalyse	Heparin	obligat
FISH	EDTA oder Heparin	fakultativ
Molekulargenetik	EDTA oder Heparin	obligat

Die chronische myeloische Leukämie (CML) zählt gemäß WHO-Klassifikation (2017) zu den myeloproliferativen, *BCR-ABL1*-positiven Neoplasien. Charakteristisch für die CML ist die Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11). Die Inzidenz der CML liegt bei 1,5/100.000 Fälle pro Jahr mit einem medianen Alter bei Diagnose von 55-60 Jahren. Aufgrund verbesserter Therapieoptionen und der Verfügbarkeit von zielgerichteten Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) gegen *BCR-ABL1* steigt die Überlebensrate und damit die Prävalenz der Erkrankung kontinuierlich an.

Klassifikation

Die CML zählt laut WHO Klassifikation 2017 zu den *BCR-ABL1*-positiven myeloproliferativen Neoplasien. Anhand von klinischen und hämatologischen Kriterien wird die CML in chronische Phase (CP-CML) sowie in die akzelerierte Phase (AP-CML) und Blastenphase („Blastenkrise“; BP-CML) unterteilt. Tabelle 1 vergleicht die Kriterien zur Definition der akzelerierten Phase und Blastenkrise nach Kriterien der WHO 2017 und ELN (European Leukemia Net) 2013.

CML WHO-Klassifikation 2017 (Swerdlow et al. 2017)

Myeloproliferative Neoplasien

Chronische myeloische Leukämie (CML), *BCR-ABL1*- positiv

Tabelle 1: Vergleich Kriterien zur Definition der akzelerierten Phase und Blastenkrise gemäß WHO 2017 (Swerdlow et al. 2017) und ELN 2013 (Baccarani et al. 2013)

	Akzelerierte Phase		Blastenkrise	
	WHO 2017	ELN 2013	WHO 2017	ELN 2013
Milz	Bestehende/zunehmende therapieresistente Splenomegalie	-	-	-
Leukozyten	Bestehende/zunehmende Leukozytose ($>10 \times 10^9/l$), therapieresistent	-	-	-
Blasten im PB oder KM	10-19%	15-29% oder Blasten + Promyelozyten $\geq 30\%$ und Blasten $< 30\%$	$\geq 20\%$	$\geq 30\%$
Basophile im PB	$\geq 20\%$	$\geq 20\%$	-	-
Thrombozytopenie	$>1000 \times 10^9/l$, therapieresistent $<100 \times 10^9/l$, nicht therapie-assoziiert	$<100 \times 10^9/l$, nicht therapie-assoziiert	-	-
Klonale Chromosomenveränderungen/Ph+	vorhanden	vorhanden	-	-
Extramedulläre Blastenproliferation	-	-	vorhanden	vorhanden

Es ist zu berücksichtigen, dass in nahezu allen klinischen Studien Wirksamkeit von TKI anhand der ELN-Kriterien beurteilt wurde.



Diagnostik

Zytomorphologie

Die **Zytomorphologie** dient der Sicherung der Diagnose und leistet Wesentliches zur Abgrenzung gegenüber anderen myeloproliferativen Erkrankungen. Darüber hinaus ist sie relevant für die Stadieneinteilung der CML in chronische Phase, akzelerierte Phase und Blastenkrise. Bei Verlaufskontrollen unter Therapie wird die hämatologische Remission nach zytomorphologischen Kriterien beurteilt.

Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung gehört nicht zum Standard-Diagnostik-Programm bei einer CML zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder in Remission. Wichtig ist sie allerdings im Falle einer Blastenkrise (BP) zur Abgrenzung einer myeloischen BP von einer mit lymphatischen Ursprung.

Chromosomenanalyse

Philadelphia-Translokation (Ph⁺) ist charakteristisch bei CML

Gemäß der WHO-Klassifikation ist der Nachweis eines Philadelphia-Chromosoms bzw. eines *BCR-ABL1*-Rearrangements die Voraussetzung, eine CML zu diagnostizieren. Zytogenetisch liegt das sogenannte Philadelphia Chromosom vor, welches meist aus einer reziproken Translokation zwischen dem langen Arm eines Chromosoms 9 und dem langen Arm eines Chromosoms 22 (*t(9;22)(q34;q11)*) entsteht. Dies führt auf molekularer Ebene zu einer Fusion zwischen dem auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisierten *ABL1* (Abelson)-Gen und dem auf dem langen Arm von Chromosom 22 lokalisierten *BCR* (breakpoint cluster region)-Gen. Diese sogenannte Standard-Philadelphia-Translokation findet sich bei ca. 90% der CML-Patienten. Die übrigen Patienten mit CML zeigen entweder variante Translokationen, bei welchen neben den Chromosomen 9 und 22 ein oder mehrere weitere Chromosomen in die Translokation involviert sind, oder einen unauffälligen Karyotyp. Trotz dieser zytogenetisch varianten Formen findet sich auch hier auf molekularer Ebene ein *BCR-ABL1*-Fusionsgen, das mittels Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) und/oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisbar ist. Bei Patienten mit unauffälligem Chromosomensatz entsteht das *BCR-ABL1*-Fusionsgen als Folge submikroskopischer Insertionen von Teilen des *ABL1*-Gens in den *BCR*-Locus, seltener von *BCR*-Anteilen in den *ABL1*-Locus. Diese Subgruppe wird als Philadelphia-negative, *BCR-ABL1*-positive CML bezeichnet. Bezüglich klinischem Bild, Krankheitsverlauf, Ansprechen auf Therapie und Überleben unterscheiden sich beide Patientengruppen nach den bisher vorliegenden Daten nicht von den Patienten mit einer klassischen, Philadelphia-positiven CML.

Die klassische Chromosomenanalyse ermöglicht darüber hinaus auch eine Beurteilung der zytogenetischen Remission. Für ein valides Ergebnis sollten dazu mindestens 20 Metaphasen ausgewertet werden (ISCN, ELN). Man unterscheidet zwischen einer kompletten zytogenetischen „Response“ (keine Ph⁺ Metaphasen), einer „partiellen“ (1 - 32% Ph⁺ Metaphasen), sowie einer „minor Response“ (33 - 66% Ph⁺ Metaphasen). Lassen sich unter Therapie noch $\geq 67\%$ Ph⁺ Metaphasen nachweisen, ist kein zytogenetisches Ansprechen zu verzeichnen.

Bei Krankheitsprogression treten zusätzliche Karyotyp-Veränderungen auf

Beim Übergang in die akzelerierte Phase oder Blastenkrise treten bei 75 - 85% der Patienten zusätzliche Karyotyp-Veränderungen im Philadelphia-positiven Klon auf. Die häufigsten Veränderungen, die im Rahmen der sogenannten klonalen Evolution auftreten, sind eine Trisomie 8 (+8), ein Isochromosom des langen Armes von Chromosom 17 (*i(17)(q10)*), ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom (+der(22)*t(9;22)*), oder eine Trisomie 19 (+19). Die Detektion zusätzlicher zytogenetischer Aberrationen stellt einen prognostisch ungünstigen Parameter dar und kann zwei bis sechs Monate vor dem klinischen Bild der Blastenkrise beobachtet werden.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

FISH: schnelle Diagnosesicherung an Interphase-Kernen und Metaphasen

Die FISH-Analyse kann das Vorliegen eines *BCR-ABL1*-Rearrangements innerhalb von 24 Stunden bestätigen bzw. ausschließen. Mittels FISH an Interphase-Kernen können 100 bis 200 Zellen auf das Vorliegen eines *BCR-ABL1*-Rearrangements überprüft werden. Im Gegensatz dazu werden mittels klassischer Chromosomenanalyse in der Regel nur 20-25 Metaphasen analysiert. Gegenüber der klassischen Chromosomenanalyse bietet FISH weitere Vorteile: Mit dieser Methode lässt sich auch bei Patienten mit Philadelphia-negativer, *BCR-ABL1*-positiver CML (also kryptischem *BCR-ABL1*-Rearrangement) die Diagnose sichern. Ferner kann mittels FISH das zytogenetische Ansprechen auf die Therapie sowohl an Interphase-Kernen als auch an Metaphasen überprüft und die residuelle Resterkrankung sensitiver nachgewiesen werden.

Vorteile von FISH gegenüber der klassischen Chromosomenanalyse:

- Diagnose innerhalb von 24 Stunden
- Sowohl an Interphase-Zellkernen als auch an Metaphasen durchführbar
- Auch bei Ph⁻, *BCR-ABL1*⁺ CML einsetzbar
- Nachweis einer residuellen Resterkrankung mit hoher Sensitivität

Molekulargenetik

Kontrolle des Therapieansprechens und Mutationsanalyse bei Therapieresistenz

Die Molekulargenetik mit den Methoden der PCR, Sanger-Sequenzierung oder auch zunehmend Next-Generation-Sequencing (NGS) spielt die zentrale Rolle in der CML-Diagnostik. Neben der Diagnose (Nachweis des *BCR-ABL1*-Rearrangement) werden diese diagnostischen Methoden heute sowohl zur Kontrolle des Therapieansprechens (*BCR-ABL1*-Expressionslevel) (siehe Tabelle 2) als auch zur Identifizierung von Resistenzmutationen bei Therapieversagen routinemäßig eingesetzt.

Tabelle 2: Molekulare Ansprechkriterien (nach Cross et al. 2015)

Ansprechen	% <i>BCR-ABL1/ABL1</i> (International Scale)	Log Reduktion ausgehend von IRIS Basislinie	Minimale Anzahl an <i>ABL1</i> Kopien (Sensitivität)
MR4	$\leq 0,01$	4	10 000 *
MR4.5	$\leq 0,0032$	4,5	32 000
MR5	$\leq 0,001$	5	100 000

*Jeder Wert der Doppelmessung muss mindestens 10.000 betragen, sonst wird kein MR-Status vergeben.

Bei Patienten, die mit einem TKI behandelt werden, besteht in vielen Fällen eine Assoziation zwischen dem Wiederanstieg der *BCR-ABL1*-Expression und dem Auftreten einer TKI-Resistenz. In dieser Situation sollte deshalb eine Sequenzierung auf *BCR-ABL1*-Mutationen erfolgen. Da bestimmte Mutationen Resistenzen für einzelne Tyrosinkinase-Inhibitoren vermitteln und andere TKI dagegen weiterhin wirksam sein können, ist die genaue Definition der Mutation wichtig für weitere Therapieentscheidungen.



Für die Mutationsanalyse spielt die Methode des Next-Generation-Sequencing (NGS) eine zunehmend wichtigere Rolle. Im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung können mittels NGS auch sog. „minor mutations“ mit einem Allelanteil von 1-15% detektiert werden (Soverini et al. 2013). Da solche Subklone im Verlauf der Therapie eine erhebliche Dynamik aufweisen können, spielt die frühe und sensitive Detektion solcher Mutationen eine immer stärker werdende Rolle für die Therapieentscheidung.

Molekulares Ansprechen muss nach International Scale berechnet werden

Ein **gutes molekulares Ansprechen (Major Molecular Response, MMR)** ist erreicht, wenn $\leq 0,1\%$ BCR-ABL1/ABL1 gemessen wird (siehe Tabelle 3). Das Ansprechen ist definiert durch % BCR-ABL1/ABL1 nach International Scale (IS) bzw. die Log Reduktion bezogen auf die IRIS-Basislinie. Der Wert nach IS wird berechnet, indem % BCR-ABL1/ABL1 mit dem laborspezifischen Konversionsfaktor multipliziert wird. Der Konversionsfaktor wird im Vergleich zu einem Referenzlabor bestimmt und beträgt derzeit für unser Labor 1,000 (bis 30.04.2017: 0,989). Weiterhin muss für die Vergabe eines MR-Status die entsprechende Sensitivität erreicht werden, die durch die Summe der ABL1-Kopien in den durchgeführten Messungen repräsentiert wird.

Die Richtlinien nach Cross et al. 2015 beinhalten unter anderem, dass alle gemessenen BCR-ABL1 Kopienzahlen <3 mit 3 Kopien gleichgesetzt werden, um eine Überinterpretation der Messwerte zu verhindern und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren zu ermöglichen. Dies kann zu Unterschieden in der Bewertung ein und desselben Ergebnisses zwischen den oben genannten und den zuvor gültigen Richtlinien führen und somit zu Unterschieden im MR-Status.

Da die nested-PCR Analysen keinen Einfluss auf die Einteilung des MR-Status nach Cross et al. 2015 haben, werden diese nicht mehr routinemäßig durchgeführt. Ferner gewährleistet eine optimierte Aufarbeitungsmethode eine deutlich höhere Anzahl an messbaren Kopien in der quantitativen PCR und damit eine höhere Sensitivität.

Prognose

Zusätzliche zytogenetische Aberrationen sind mit schlechterer Prognose assoziiert

Bei bis zu 10% der Patienten werden bei Erstdiagnose neben der Philadelphia-Translokation zusätzliche zytogenetische Aberrationen beobachtet. Man unterscheidet zwischen sog. „major route“ Zusatzaberrationen, zu welchen die Trisomien der Chromosomen 8 (+8) und 19 (+19), das Isochromosom 17q (i(17q)) und ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom (+der(22)t(9;22)) zählen, und den „minor route“ Zusatzaberrationen, die alle anderen Aberrationen umfassen. Als typische „minor route“ Zusatzaberrationen gelten -7, -17, +17, +21, -Y und t(3;21). Das Auftreten von „major route“ Zusatzaberrationen ist mit einer schlechteren Prognose und einer höheren Rate der Progression zur Akzelerationsphase bzw. Blastenkrise assoziiert (Fabarius et al. 2011).

Neuere Studien konnten erstmals die prognostische Bedeutung einzelner Zusatzaberrationen bei Erstdiagnose und im Verlauf der Erkrankung untersuchen. Es wird eine Einteilung in zwei Gruppen empfohlen. Patienten mit +8, -Y oder +der(22)t(9;22) als alleinige Zusatzaberration haben eine günstige Prognose. Liegt eine dieser Aberrationen bei Erstdiagnose vor oder tritt -Y im Verlauf der Erkrankung auf, so unterscheidet sich die Prognose nicht wesentlich von Patienten ohne Zusatzaberrationen. Zur zweiten Gruppe gehören Patienten mit i(17q), -7/del(7q), Aberrationen unter Involvierung von 3q26, sowie mehr als einer Zusatzaberration. Diese haben eine ungünstigere Prognose unabhängig davon, ob die Zusatzaberration bei Erstdiagnose oder im Verlauf auftritt (Wang et al. 2016).

Im Krankheitsverlauf ist das Auftreten von Zusatzaberrationen ein Zeichen für das Fortschreiten der Erkrankung. Etwa 70% dieser Patienten zeigen hier mindestens eine der sog. „major route“ Zusatzaberrationen. Die restlichen 30% weisen „minor route“ Zusatzaberrationen auf. Solche zusätzlichen chromosomalen Veränderungen können bereits 2-6 Monate vor Auftreten der klinischen Symptomatik einer Blastenkrise beobachtet werden und gehen fast immer mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf einher (Marin et al. 2008). Bei Therapieversagen mit den heute verwendeten TKI ist das Auftreten von Zusatzaberrationen - neben Punktmutationen in der ABL1-Kinasedomäne - eine mögliche Ursache einer Therapie-Resistenz.

Qualität des Ansprechens nach 3 Monaten prädiktiv für tiefe molekulare Remission

Die Tiefe des molekularen Ansprechens nach drei Monaten ist ein prognostischer Faktor dafür, ob Patienten nach 18 Monaten eine tiefe molekulare Remission (MR4,5) erzielen. Laut ELN-Kriterien sollten Patienten nach 3 Monaten optimaler Weise ein gutes molekulares Ansprechen mit BCR-ABL1/ABL1 nach IS von $\leq 10\%$ erreicht haben. Ist dies nicht der Fall, kann eine TKI-Resistenz durch eine oder mehrere BCR-ABL1-Mutationen zu Grunde liegen und in Abhängigkeit des Mutationsstatus einen Wechsel des TKI erforderlich machen.

Das Erreichen tiefer molekularer Remissionen minimiert das Risiko des Verlustes der CCyR oder MMR. Bisher konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden, ob eine tiefere molekulare Remission mit einem längeren Überleben assoziiert ist. (Falchi et al. 2013; Hehlmann et al. 2014; Kantarjian, Cortes 2014).

Therapie

Zytogenetisches und molekulares Ansprechen entscheidend für Therapieverlauf

Das zytogenetische und molekulare Ansprechen auf eine TKI-Therapie ist ein entscheidender prognostischer Parameter mit Konsequenzen für die weitere Therapieplanung. Das molekulare Monitoring während der Therapie mittels Real-Time PCR ist heute Standard in der CML-Diagnostik. Die empfohlenen Untersuchungsintervalle und Methoden zur Überprüfung des Ansprechens sind in Tabelle 3 zusammengefasst.


Tabelle 3: Monitoring des Ansprechens auf TKI nach ELN (nach Baccarani et al. 2013)

Untersuchungs- methode	Untersuchungszeitpunkte				
	Diagnose	innerhalb der ersten 3 Monate	nach 3 Monaten	nach 6 Monaten	später
Morphologie	x	Alle 2 Wochen bis zur kompletten hämatologischen Remission	x	x	<ul style="list-style-type: none"> alle 3 Monate und wenn klinisch erforderlich
Zytogenetik (Knochenmark)	x	-	x	x	<ul style="list-style-type: none"> alle 6 Monate bis zur kompletten zytogenetischen Remission, danach alle 12 Monate bei V.a. TKI-Resistenz bei unklarer Zytopenie
Molekulargenetik (RT-PCR)	x	-	x	x	<ul style="list-style-type: none"> alle 3 Monate bis zur MMR, dann alle 3-6 Monate nach Absetzen (im Rahmen von Studien) * alle 4 Wochen im 1. Halbjahr * alle 6 Wochen im 2. Halbjahr * danach alle 3 Monate

Definition des molekularen Ansprechens auf TKI

Die Definition von optimalem Ansprechen auf eine Behandlung mit einem TKI bzw. Therapieversagen sind in Tabelle 4 dargestellt. Zwischen optimalem Ansprechen und Therapieversagen liegt ein Warnbereich, in dem Patienten eine engmaschige Kontrolle benötigen. Bei einem Therapieversagen sollte nach den Empfehlungen des ELN (European Leukemia Net) eine Umstellung der Therapie auf einen alternativen TKI in Erwägung gezogen werden. Einem Wechsel der Therapie sollte auf jeden Fall eine *BCR-ABL1*-Mutationsanalyse vorangehen, um, je nach Art der Punktmutation in der *ABL1*-Kinasedomäne, die optimale Auswahl für einen alternativen TKI treffen zu können (Baccarani et al. 2013). Eine Mutationsanalyse wird außerdem empfohlen bei wiederholter Verdopplung des *BCR-ABL1/ABL1*-Wertes (in %), bei suboptimalem Ansprechen oder bei primärer Resistenz.



Tabelle 4: Definition des Ansprechens auf TKI (nach Baccarani et al. 2013)

Zeitpunkt	Therapieversagen	Warnsignal (engmaschige Kontrolle nötig)	Optimales Ansprechen
Diagnose		<ul style="list-style-type: none"> • Hochrisiko* • major route Zusatzaberration 	
3 Monate nach Therapiebeginn	<ul style="list-style-type: none"> • keine komplette hämatologische Remission • >95% Ph+ Metaphasen 	<ul style="list-style-type: none"> • 36-95% Ph+ Metaphasen • >10% BCR-ABL1/ABL1 	<ul style="list-style-type: none"> • ≤35% Ph+ Metaphasen • ≤10% BCR-ABL1/ABL1
6 Monate nach Therapiebeginn	<ul style="list-style-type: none"> • >35% Ph+ Metaphasen • >10% BCR-ABL1/ABL1 	<ul style="list-style-type: none"> • 1-35% Ph+ Metaphasen • 1-10% BCR-ABL1/ABL1 	<ul style="list-style-type: none"> • komplette zytogenetische Remission • <1% BCR-ABL1/ABL1
12 Monate nach Therapiebeginn	<ul style="list-style-type: none"> • keine CCyR • >1% BCR-ABL1/ABL1 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1-1% BCR-ABL1/ABL1 	<ul style="list-style-type: none"> • ≤0,1% BCR-ABL1/ABL1
18-24 Monate nach Therapiebeginn			<ul style="list-style-type: none"> • ≤0,01% BCR-ABL1/ABL1
Jederzeit	<ul style="list-style-type: none"> • Rezidiv • Verlust der CCyR oder MMR • Mutationen • Zusatzaberrationen 	<ul style="list-style-type: none"> • Ph- Klon mit -7 oder 7q- 	<ul style="list-style-type: none"> • ≤0,01% BCR-ABL1/ABL1

* nach klinischen Prognose-Scores (EUTOS, Euro bzw. Sokal)

Von einer kompletten zytogenetischen Remission (CCyR) spricht man, wenn keine Philadelphia-positiven Metaphasen in der Chromosomenanalyse mehr nachweisbar sind. Finden sich 1 - 35% bzw. 36 - 65% Philadelphia-positive Metaphasen, bezeichnet man dies als partielles bzw. „minor“ Ansprechen. Ein minimales zytogenetisches Ansprechen liegt bei Nachweis von 66 - 95% Philadelphia-positiven Metaphasen vor.

Engmaschige Kontrolle bei Philadelphia-negativen zytogenetischen Klonen

Während einer Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickeln 5-10% der Patienten in zytogenetischer Remission chromosomale Aberrationen in Philadelphia-negativen Klonen, die man von der klonalen Evolution des Philadelphia-positiven Klonen unterscheiden muss. Die häufigste Veränderung in dieser Hinsicht ist die Trisomie 8 (+8). Es wurden aber auch Fälle mit Verlust des Y-Chromosoms (-Y) und Deletionen im langen Arm von Chromosom 12 (del(12q)) sowie diversen anderen Veränderungen beschrieben. Die Bedeutung derartiger Philadelphia-negativer Klone ist jedoch noch weitgehend unklar (Abruzzese et al. 2007, Jabbour et al. 2007, Deininger et al. 2007, Marin et al. 2008). Eine Assoziation zur Entwicklung eines MDS bzw. einer AML – insbesondere bei Vorliegen einer Monosomie 7 oder Vorliegen von Zytopenien bzw. Dysplasien – wurde in einzelnen Fällen beschrieben. Diese Patienten sollten engmaschig untersucht werden (Baccarani et al. 2013).

Referenzen

Die zugehörigen Referenzen finden Sie hier:

<https://www.mll.com/diagnostisches-angebot/myeloproliferative-neoplasien/chronische-myeloische-leukaemie-cml.html#referenzen>