

Masterarbeit



NEUE OBERFLÄCHENANTIGENE ALS POTENTIELLE  
THERAPEUTISCHE TARGETS BEI CHRONISCHER  
MYELOMONOZYTÄRER LEUKÄMIE (CMML)

eingereicht von

BSc., Lisa Hemetsberger

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinische Abteilung für Hämatologie/UKIM/MUG

unter der Anleitung von Betreuer

Wölfler Albert, ao. Univ. Prof. Dr.

Graz, 05.2024

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 04.2024

## ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) ist eine seltene maligne Erkrankung, die sich durch eine klonale Hämatopoese mit Monozytose und zunehmender Knochenmarkinsuffizienz auszeichnet. Sie wird laut WHO-Klassifikation zu den myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien gezählt und trotz Fortschritten in den letzten Jahren ist die Therapie der CMML immer noch schwierig und bislang ohne durchschlagende Erfolge geblieben.

Ziel dieser Masterarbeit war die Charakterisierung bestimmter Oberflächenmarker auf neoplastischen Monozyten und CD34-positiven myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSC) von Patient\*innen mit CMML im Vergleich zu gesunden Knochenmarkszellen, um neue Antigene, die für eine zielgerichtete Immuntherapie, zum Beispiel mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern oder CAR T-Zellen, geeignet sind, zu identifizieren.

Insgesamt wurden 28 pseudonymisierte CMML-Patient\*innen in die Studie eingeschlossen und mit 21 Normalproben (8 Proben aus dem Knochenmark und 13 aus dem peripheren Blut) bezüglich der Expression von CD13, CD33, CD36, CD64, CD85d, CD88, CD97, CD120b, CD191, CD312 und C3AR mittels standardisierter Durchflusszytometrie verglichen. CD14, CD16, CD34, CD38, CD117 und CD45 wurden als Backbone-Marker zur Identifizierung der Monozyten(-Subpopulationen) und hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen verwendet.

Da in den CMML-Proben, entsprechend der bekannten Literatur, die M1-Monozyten mit durchschnittlich >98% aller Monozyten vorherrschten, konnte eine Analyse der M1- und M2-Subpopulation hinsichtlich ihrer Markerexpression nur in den physiologischen Normalproben durchgeführt werden. Hier zeigten physiologische M2-Monozyten eine hochsignifikant höhere Expression von CD312, CD85d, C3AR und CD88 im Vergleich zu M1-Monozyten. CD64, CD36, CD97 und CD 33 waren im Gegensatz dazu in M2-Monozyten signifikant geringer exprimiert. Neoplastische Monozyten von CMML-Patient\*innen zeigten eine

höhere interindividuelle Variation in der Expression der einzelnen Marker als Ausdruck der Zelldysplasie, mit Ausnahme von CD33 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression der einzelnen Marker im Vergleich zu normalen M1-Monozyten gefunden werden. In HSC zeigte sich in den CMML-Proben eine hochsignifikante Erhöhung der CD312-Expression, während die übrigen Oberflächenantigene nicht signifikant unterschiedlich zwischen CMML- und Normalproben exprimiert waren. Interessanterweise wurde CD312 bereits erfolgreich als Zielantigen für eine Immuntherapie mittels CAR T-Zellen bei akuter myeloischer Leukämie beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei M1- und M2-Monozyten physiologischerweise eine signifikant unterschiedliche Expression der Oberflächenmarker CD312, CD85d, C3AR, CD88, CD64, CD36, CD97 und CD 33 findet, während sich die Expression dieser Marker mit Ausnahme von CD33 in CMML-Monozyten nicht von normalen M1-Monozyten unterscheidet. Da die Expression von CD312 in HSC bei CMML-Patient\*innen im Vergleich zu gesunden HSC unabhängig von bestimmten genetischen Veränderungen deutlich erhöht war, könnte dieses Antigen ein universelles Ziel für immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung der CMML, zum Beispiel mit CAR T-Zellen, darstellen.

## ABSTRACT

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a rare myeloid malignancy characterized by clonal hematopoiesis with monocytosis and progressive bone marrow insufficiency. Despite progress in recent years, treatment options for CMML are still scarce and curative approaches aside from allogeneic stem cell transplantation are lacking.

The aim of this master's thesis was to characterize novel surface markers on neoplastic monocytes and CD34-positive hematopoietic stem and progenitor cells (HSC) from patients with CMML in comparison to healthy bone marrow cells in order to identify new antigens that are suitable for targeted immunotherapy.

A total of 28 pseudonymized CMML patients were included in the study and compared with 21 normal samples (8 samples from the bone marrow and 13 from the peripheral blood) for the expression of CD13, CD33, CD36, CD64, CD85d, CD88, CD97, CD120b, CD191, CD312 and C3AR using standardized flow cytometry. CD14, CD16, CD34, CD38, CD117 and CD45 were used as backbone markers to identify (subpopulations of) monocytes and HSC.

Since M1 monocytes predominated in the CMML samples with an average of >98% of all monocytes according to the known literature, an analysis of the M1 and M2 subpopulations with regard to their marker expression could only be carried out in normal samples. Here, physiological M2 monocytes showed a significantly higher expression of CD312, CD85d, C3AR and CD88 as compared to M1 monocytes. In contrast, CD64, CD36, CD97 and CD 33 were significantly lower expressed in M2 monocytes. Neoplastic monocytes showed a higher interindividual variation in the surface marker expression, which may reflect monocytic dysplasia, but with the exception of CD33, no significant difference could be found in the expression of the individual markers in CMML patients compared to normal M1 monocytes. In HSC, there was a highly significant increase in CD312 expression in CMML samples independent of their mutational profile, while the remaining surface antigens were not differently expressed.

Interestingly, CD312 has already been successfully described as a target antigen for immunotherapy using CAR T cells in acute myeloid leukemia.

In summary, we identified a significantly different expression of the surface markers CD312, CD85d, C3AR, CD88, CD64, CD36, CD97 and CD 33 in physiological M1 versus M2 monocytes, but, except for CD33, the expression of these markers did not differ in CMML monocytes from normal M1 monocytes. However, since the expression of CD312 in HSCs was significantly increased in all CMML patients compared to healthy HSCs, this antigen could represent a universal target for immunotherapeutic approaches to treat CMML.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	CHRONISCHE MYELOMONOZYTÄRE LEUKÄMIE (CMML)	1
1.1.1	ALLGEMEINES	1
1.1.2	DIAGNOSE UND KLASSIFIKATION	3
1.1.3	RISIKOSTRATIFIZIERUNG	7
1.1.4	GENETIK UND PATHOGENESE	8
1.1.5	THERAPIE	11
2	HYPOTHESE UND ZIEL	13
3	MATERIALIEN UND METHODEN	14
3.1	MATERIALIEN	14
3.1.1	PATIENTENPROBEN	14
3.1.2	MATERIALIEN: REAGENZIEN UND ANTIKÖRPER	14
3.1.3	GERÄTE, AUSWERTESOFTWARE	17
3.2	METHODEN	17
3.2.1	HINTERGRUNDINFORMATIONEN ZUR DURCHFLUSSZYTOMETRIE	17
3.2.2	HINTERGRUNDINFORMATIONEN ZU DEN CHARAKTERISIERTEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN	20
3.2.3	GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CMML-PROBEN MITTELS NEXT GENERATION SEQUENCING	22
3.3	PROBENAUFBEREITUNG	24
3.3.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	26
3.3.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG	29
4	RESULTATE	30
4.1	PATIENTENCHARAKTERISTIK	30

4.2	VERTEILUNG VON M1- UND M2-MONOZYTEN IN CMML- BZW. NORMALPROBEN _____	30
4.3	MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NORMALEN M1- UND M2-MONOZYTEN _____	33
4.4	MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NEOPLASTISCHEN MONOZYTEN UND CD34 <sup>+</sup> BLASTEN VON CMML-PATIENT*INNEN	38
4.5	ANALYSE DER GENETISCHEN DATEN _____	46
5	DISKUSSION _____	48
5.1	VERHÄLTNIS M1- UND M2-MONOZYTEN ZUR DIAGNOSTIK EINER CMML _____	48
5.2	MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NORMALEN M1- UND M2-MONOZYTEN _____	49
5.3	MARKEREXPRESSION BEI MONOZYTEN UND CD34 <sup>+</sup> BLASTEN BEI CMML-PATIENT*INNEN _____	50
6	FAZIT UND AUSBLICK _____	52
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS _____	XII

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MPN	myeloproliferative Neoplasie
PB	Peripheres Blut
KM	Knochenmark
tCMML	therapieassoziierte chronische myelomonozytäre Leukämie
SZT	Stammzelltransplantation
HSC	hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
CPSS	CMML-Specific Prognostic Scoring System
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
NGS	Next Generation Sequencing
FSC	Forwardscatter
SSC	Sidescatter
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Bzw.	Beziehungsweise
z.b.	zum Beispiel
Go	Gemtuzumab-Ozagamicin

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1   Das Kontinuum der chronischen myeloischen Neoplasien _____	2
Abb. 2   Lichteinfall auf einen Granulozyten und dessen Streulichtverhalten _	18
Abb. 3   Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers _____	19
Abb. 4   Prozent-positiver Anteil Gating Strategie _____	27
Abb. 5   Ausschluss von Zelldeprit → Ausschluss von Dupletten → Gating der Monozyten und Lymphozyten → Gating der einzelnen Subpopulationen in MNC _____	28
Abb. 6   Gating von M1 Monozyten und M2 Monozyten, beispielhaft gezeigt bei zwei CMML Proben (obere Reihe) und zwei Normalproben (untere Reihe) zur Berechnung des M1 / M2 Verhältnis _____	31
Abb. 7   Prozentualer Anteil (Mittelwert ± Standardabweichung) von M1 / M2 Monozyten in CMML- und Normalproben. _____	32
Abb. 8   Gegenüberstellung aller verwendeter Oberflächenmarker zur Differenzierung von M1 und M2 Monozyten. _____	36
Abb. 9   Markerexpressionen der M1 und M2-Monozyten _____	37
Abb. 10   MFI Ratio des geometrischen Mittels der Marker CD312, CD64, CD120b, CD97, CD85d, CD88, C3AR, CD36, CD33, CD13, CD191 bei Monozyten von CMML Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe ____	40
Abb. 11   Signifikanter Unterschied der Expression des Markers CD33 in Monozyten von CMML- und Normalproben (p=0,0108)._____	41
Abb. 12   MFI Ratio des geometrischen Mittels der Marker CD312, CD191, CD120b, CD97, CD85d, CD88 und C3AR bei CD34 <sup>+</sup> Blasten von CMML Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe _____	42

- Abb. 13 | Hochsignifikanter Unterschied der Expression des Markers CD312 in CD34<sup>+</sup>-Zellen von CMML- und Normalproben ( $p= 0,0003$ ). \_\_\_\_\_ 43
- Abb. 14 | Gegenüberstellung der Expression einzelner Marker in Monozyten und CD34<sup>+</sup> Zellen bei CMML-Patient\*innen im Vergleich zu den Kontrollproben. (Abkürzungen: ns = non signifikant, \*\* $p=0,0027$ , \*\*\* $p=0,0003$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ ) \_\_\_\_\_ 46
- Abb. 15 | MFI Ratio des geometrischen Mittels von CD34<sup>+</sup> Blasten ( CD312) von den 19 inkludierten CMML-Proben mit Mutationen die den RAS-Signalweg aktivieren, *SRSF2*-Mutation, *TET2*-Mutation sowie *TET2 und SRSF2 Mutationen* im Vergleich zu Patienten ohne Mutation. \_\_\_\_\_ 47

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1   Diagnosekriterien CMML laut WHO 2022 [9]	5
Tabelle 2   Relative Häufigkeit in Prozent von somatischen Mutationen bei Patient*innen mit CMML [8]	10
Tabelle 3   Antikörper Pipettierschema	25
Tabelle 4   Prozentanteil der M1- und M2-Monozyten bei den CMML-Proben	33
Tabelle 5   Prozentanteil der M1- und M2-Monozyten bei Normalproben Proben	33

# 1 EINLEITUNG

Maligne Erkrankungen beziehungsweise Krebserkrankungen verursachen global gesehen die meisten Todesfälle und waren im Jahr 2022 für schätzungsweise 10 Millionen Todesfälle verantwortlich. Etwa einer von sechs Todesfällen weltweit ist daher auf Krebs zurückzuführen. Laut Prognose der International Agency for Research on Cancer wird die Zahl der krebsbedingten Todesfälle bis 2025 auf rund 18,5 Millionen steigen. [1]

Leukämieerkrankungen machen unter den Krebserkrankungen nur einen geringen Anteil aus. Bei der Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung, die durch eine übermäßige Produktion unreifer oder abnormer Leukozyten gekennzeichnet ist, die schließlich die Produktion normaler Blutzellen unterdrückt und zu zytopenischen Symptomen führt. Die maligne Transformation erfolgt in der Regel auf der Ebene der Stamm- und Progenitorzellen (HSC), wobei abnorme Proliferation und Differenzierung, klonale Expansion und verminderte Apoptose zur Verdrängung der normalen Blutbestandteile durch maligne Zellen führen. Nach Schätzungen der American Cancer Society wird es in den USA im Jahr 2024 etwa 60.000 neue Fälle an Leukämie (alle Arten) und etwa 24.000 dadurch bedingte Todesfälle geben. [2], [3]

## 1.1 CHRONISCHE MYELOMONOZYTÄRE LEUKÄMIE (CMML)

### 1.1.1 ALLGEMEINES

Leukämien kann man nach dem Krankheitsverlauf in akute oder chronische Formen, beziehungsweise nach dem vorherrschenden Zelltyp in lymphatische oder myeloische Leukämien unterteilen. Die akute lymphatische (ALL) und die akute myeloische Leukämie (AML) sind durch unreife Zellen, den sogenannten

Blasten, charakterisiert. Diese akuten Leukämien zeigen meist ein plötzliches Auftreten sowie ein rasches Fortschreiten der Erkrankung. Daher sind bei akuten Leukämien eine schnelle Diagnose und Behandlung notwendig. Chronische Leukämien, wie zum Beispiel die chronische lymphatische Leukämie (CLL) oder chronische myeloische Leukämie (CML) zeigen reife ausdifferenzierte Zellen und haben klinisch eine langsamere Progression.

Die relativ seltene CMML stellt eine maligne hämatologische Erkrankung dar, die durch eine Vermehrung pathologischer Monozyten im peripheren Blut, sowie einer ineffektiven Hämatopoese im Knochenmark (KM) gekennzeichnet ist. Bei der CMML handelt es sich um eine klonale Erkrankung der HSC mit Merkmalen sowohl der myelodysplastischen Neoplasien (MDS) als auch der myeloproliferativen Neoplasien (MPN), wie Abb. 1 veranschaulicht. [4]

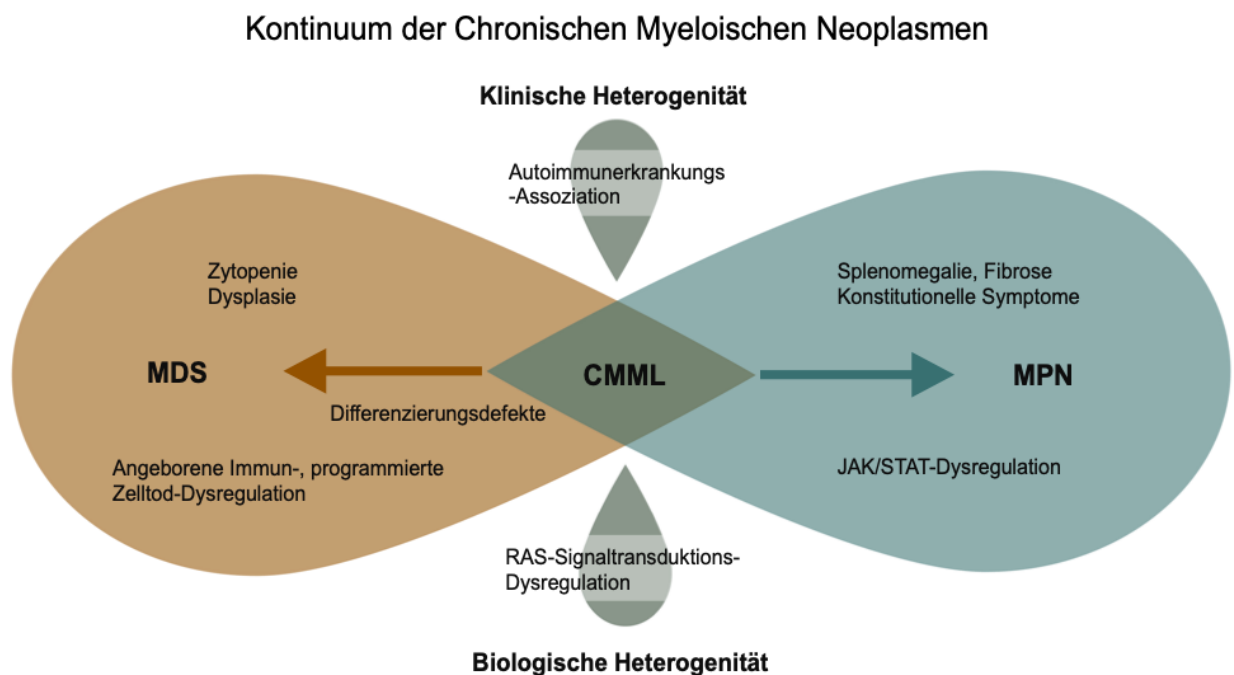


Abb. 1 | Das Kontinuum der chronischen myeloischen Neoplasien

Abbildung nach O. Chan, A. Renneville, und E. Padron, „Chronic myelomonocytic leukemia diagnosis and management“, *Leukemia*, Bd. 35, Nr. 6. Springer Nature, S.1552–1562, 1. Juni 2021. doi: 10.1038/s41375-021-01207-3

Die Abbildung zeigt die klinische und biologische Heterogenität chronischer myeloischer Neoplasien. Diese reichen von myelodysplastischen Syndromen (MDS) über chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) bis hin zu myeloproliferativen Neoplasien (MPN). [4]

Die Inzidenz der CMML wird auf vier pro 100.000 pro Jahr geschätzt. Da die durchschnittliche Überlebenszeit von CMML-Patient\*innen nur zwei bis drei Jahre beträgt, ist auch die Prävalenz der Erkrankung sehr niedrig. Dementsprechend wird die CMML zu den seltenen Erkrankungen (sogenannte „orphan diseases“) gezählt. Nahezu 90% der Fälle treten bei Patient\*innen im Alter von über 60 Jahren auf. Männer sind hierbei deutlich häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis 3:1). [4]

Da sich die Krankheit nur bei 3% unter 50 Jahren manifestiert, ist ein höheres Alter (>60 Jahre) als Risikofaktor anzunehmen. Auch eine Exposition gegenüber organischen Lösungsmitteln oder eine vorangegangene Chemo- oder Strahlentherapie sind anerkannte Risikofaktoren. Durch die Assoziation mit bestimmten Immunphänomenen, finden sich in etwa 20% der Fälle (vorausgehende) Autoimmunerkrankungen, wobei Vaskulitiden, die idiopathische Thrombozytopenie, eine Psoriasis, eine rheumatoide Polyarthrititis und Neutrophilendermatosen (Sweet-Syndrom) am häufigsten sind. Insgesamt wird angenommen, dass für die CMML aufgrund der Überlappung mit den MDS in Bezug auf Manifestationsalter und klinische Manifestation ähnliche Risikofaktoren gelten wie für MDS. [5]

In etwa 10 % der Fälle von CMML liegt eine therapieassoziierte Form (tCMML) vor, die sich hinsichtlich der Zytogenetik mit dem therapieassoziierten MDS vergleichen lässt und sind mit einer schlechten Prognose behaftet ist. Das Risiko einer AML-Transformation wird auf 15-30% geschätzt. [5], [6]

### 1.1.2 DIAGNOSE UND KLASSIFIKATION

Bei vielen Patient\*innen wird die CMML zufällig bei einer Blutuntersuchung entdeckt, Maßnahmen zur Früherkennung sind nicht etabliert. Die Symptome der CMML sind oft unspezifisch und können langsam fortschreiten. Einige Patient\*innen haben jedoch klinische Beschwerden, die zu einer diagnostischen

Abklärung führen. Die Symptomatik der CMML wird neben der B-Symptomatik wie Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Fatigue und einer allgemeinen Leistungsminderung vor allem durch das Ausmaß der hämatopoetischen Insuffizienz bestimmt. Das klinische Bild richtet sich je nach CMML-Typ. Bei einer MDS-CMML zeigen sich häufig eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten (Neutropenie) und damit eine Neigung zu Infekten und/oder eine (transfusionspflichtige) Anämie. Da auch eine Thrombopenie auftreten kann, findet sich immer wieder auch eine Neigung zu Zahnfleischblutungen, Petechien und Hämatomen. Zudem kann eine Splenomegalie, sowie selten auch eine Infiltration von myelomonozytäre Zellen in der Haut oder Pleura vorliegen. [5]

Die CMML ist charakterisiert durch eine Anhäufung von Monozyten, also eine persistierende Monozytose ( $\geq 0,5 \times 10^9/L$ ) über drei Monate im peripheren Blut (PB), die mindestens 10% der Leukozyten ausmacht. Weiters liegt entweder eine Dysplasie, die eine oder mehrere myeloische Linien betrifft, oder eine erworbene klonale zytogenetische oder molekulargenetische Anomalie hämatopoetischer Zellen vor. [4], [7]

Aufgrund neuer klinischer, morphologischer und molekularer Erkenntnisse empfiehlt die WHO-Klassifikation 2022 (siehe Tabelle 1) eine Einteilung der CMML in eine proliferative MPN-CMML basierend auf einer Leukozytenzahl von  $\geq 13 \times 10^9/L$  oder eine dysplastische MDS-CMML  $< 13 \times 10^9/L$ . Die proliferative Form, MPN-CMML, ist häufiger mit einer Aktivierung des Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Signalwegs in den leukämischen Zellen und einem schlechteren Ergebnis verbunden. Zudem wird die CMML laut WHO in folgende Untergruppen unterteilt:

- × CMML-1:  $< 5\%$  periphere Blasten und  $< 10\%$  Blasten im KM
- × CMML-2:  $> 5\%$  periphere Blasten und  $> 10-19\%$  Blasten im KM [8], [9]

Die frühere Untergruppe CMML-0 wurde in die Untergruppe CMML-1 integriert, da hier kein großer prognostischer Unterschied vorliegt. Eine CMML-2 ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. [5]

Tabelle 1 | Diagnosekriterien CMML laut WHO 2022 [9]

<p>Voraussetzende Kriterien:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Persistierende absolute (<math>\geq 0,5 \times 10^9/L</math>) und relative (<math>\geq 10\%</math>) PB-Monozytose</li><li>2) Blastenanteil von <math>&lt; 20\%</math> im PB und KM</li><li>3) Nichterfüllung der Diagnoskriterien einer CML oder anderen myeloproliferativen Neoplasien</li><li>4) Nichterfüllung der Diagnoskriterien von myeloischen/lymphatischen Neoplasien mit Vorliegen eines Tyrosinkinasefusionengens</li></ol>
<p>Unterstützende Kriterien:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Dysplasien in <math>\geq 1</math> myeloischen Zellreihe</li><li>2) Erworbene klonale zytogenetische oder molekulare Anomalien</li><li>3) Abnorme Monozytenpopulationen (<math>&gt; 94\%</math> an klassischen Monozyten <math>CD14^+, 16^-</math>)</li></ol>
<p>Anforderungen an die Diagnose:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>× Die voraussetzenden Kriterien müssen in allen Punkten erfüllt sein</li><li>× Wenn die Monozytose <math>\geq 1 \times 10^9</math> beträgt muss ein unterstützendes Kriterium erfüllt sein</li><li>× Wenn die Monozytose <math>\geq 0,5</math> und <math>&lt; 1 \times 10^9/L</math> beträgt müssen die unterstützenden Kriterien eins und zwei erfüllt sein</li></ul>
<p>Untertypisierungskriterien:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>× Myeloproliferative MPN-CMML basierend auf einer Leukozytenzahl von <math>\geq 13 \times 10^9/L</math></li><li>× Myelodysplastische MDS-CMML <math>&lt; 13 \times 10^9/L</math></li></ul>
<p>Untergruppierungskriterien (basiert auf dem Prozentsatz an Blasten und Promonozyten):</p> <ul style="list-style-type: none"><li>× CMML-1: <math>&lt; 5\%</math> periphere Blasten und <math>&lt; 10\%</math> im KM</li><li>× CMML-2: <math>&gt; 5\%</math> periphere Blasten und <math>&gt; 10-19\%</math> im KM</li></ul>

Neben der histologischen und zytologischen Untersuchung des KM werden zur Unterstützung der Diagnostik die Immunphänotypisierung (Durchflusszytometrie), Zytogenetik und Molekulargenetik herangezogen. Teil der Erstdiagnose stellt die molekulare Untersuchung mittels Next Generation Sequencing (NGS) dar, ein *BCR-ABL1*-Rearrangement sollte ausgeschlossen werden. Beim Vorliegen einer Eosinophilie sollten auch *PDGFRA*-, *PDGFRB*- und *FGFR1*-Rearrangements oder eine *PCM1*- und *JAK2*-Fusion ausgeschlossen werden. Bei mehreren myeloproliferativen Neoplasien tritt eine Monozytose auf. Deshalb schließt laut WHO eine vorangegangene dokumentierte MPN eine CMML aus. Ein Nachweis von MPN-assoziierten Mutationen in *JAK2*, *CALR* oder *MPL* spricht eher für eine MPN mit Monozytose als für eine CMML. [7], [10]

Die Zytogenetik spielt eine wesentliche Rolle bei der Diagnose, Prognose und Therapieplanung der CMML. Bei ca. 20% der Patient\*innen liegt bei der Chromosomenanalyse kein normaler Karyotyp vor. Daher sollte bei der Diagnose unbedingt eine Chromosomenanalyse durchgeführt werden. Auch eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung kann als Ergänzung zur Chromosomenanalyse herangezogen werden. [11]

Die Immunphänotypisierung stellt ein wichtiges Verfahren zur Unterscheidung zwischen einer klonalen Monozytose im Rahmen einer CMML und reaktiven Monozytosen dar. Das Verfahren ermöglicht nicht nur die Diagnose von CMML, sondern kann auch prognostische Informationen liefern. Dabei ermöglicht die gleichzeitige Analyse der Expression von CD14 und CD16 meist die Abgrenzung einer reaktiven Monozytose von einer CMML. Die Klassifikation der physiologischen und pathologischen Monozyten basiert auf der Expression dieser Oberflächenantigene. Dabei werden physiologischer-Weise zwei Hauptgruppen unterschieden, deren Anteil an allen Monozyten im PB in der Literatur mit 80-90% für die klassischen Monozyten (M1-Subpopulation; CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>), sowie 10-20% für die nichtklassischen Monozyten (M2-Subpopulation; CD14<sup>Low</sup>, CD16<sup>+</sup>) angegeben wird. Manche Autoren grenzen auch noch eine intermediäre Monozytenpopulation (CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) ab, die aber den nichtklassischen Monozyten zugerechnet wird [12]. Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich auch durch ihre Genexpressionsprofile, Expressionen von

Chemokinrezeptoren, sowie phagozytischen Aktivitäten und Stoffwechselabhängigkeiten voneinander. [10], [13]

In der Gegenüberstellung der Monozyten-Untergruppen bei gesunden Spendern und Patient\*innen mit reaktiver Monozytose bzw. Patient\*innen mit WHO-definierter CMML konnte ein signifikant höherer Anteil an klassischen Monozyten festgestellt werden. Diese abnorme Verteilung war unabhängig vom Alter, der absoluten Zahl der Monozyten, dem CMML-Phänotyp (proliferativ oder dysplastisch), sowie somatischen Genmutationen [14]. Eine Erhöhung der klassischen Monozyten mit CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>-Phänotyp (Cut-off 94%) ist hochspezifisch und hochsensitiv für das Vorliegen einer CMML im Gegensatz zu sekundären/reaktiven Monozytosen. [12]

### 1.1.3 RISIKOSTRATIFIZIERUNG

Eine genaue Risikostratifizierung der CMML ist entscheidend für das Management und die Therapieplanung. Die Anwendung von Risiko-Scores, wie beispielsweise dem CMML-specific Prognostic Scoring System (CPSS) und dem CPSS-molekular, ermöglicht eine Abschätzung der Prognose von Patient\*innen hinsichtlich ihres Gesamtüberlebens sowie des Risikos einer Progression in eine AML. Die wichtigsten Parameter, die im CPSS berücksichtigt werden, umfassen das Patientenalter, die Anzahl der Leukozyten pro  $\mu\text{l}$ , den prozentualen Anteil der Blasten, die Anzahl der Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  und das Vorhandensein einer Anämie. Basierend auf diesen Parametern lassen sich vier Risikogruppen von niedrig bis hoch definieren, die sich in Bezug auf das Gesamtüberleben und das leukämiefreie Überleben voneinander unterscheiden. Der CPSS-molekular erweitert den CPSS und bezieht zusätzlich molekulargenetische Marker mit ein, wie zum Beispiel Mutationen im *ASXL1*-, *SRSF2*-, oder *RUNX1*-Gen. Durch die Einbeziehung dieser genetischen Marker kann der CPSS-molekular eine

genauere Prognose liefern und eine verbesserte Risikostratifizierung für Patient\*innen mit CMML ermöglichen. [4]

#### 1.1.4 GENETIK UND PATHOGENESE

Die Pathogenese der CMML ist komplex und beinhaltet genetische sowie epigenetische Veränderungen. Der Entwicklung einer CMML beginnt in den HSC, die durch die im nächsten Abschnitt genannten genetische Mutationen verändert werden. Diese Mutationen stören die normale Funktion der HSC, was zu einer veränderten Differenzierung und vermehrten Proliferation führt. Diese HSC bilden dann eine klonale Zellpopulationen, die sich unkontrolliert vermehren und schließlich die normale hämatopoetische Zellbildung verdrängen kann. Diese klonale Proliferation ist ein zentrales Merkmal der CMML.

Durch die gestörte Differenzierung der HSC kommt es zudem zu einer Dysplasie, insbesondere in der myeloischen Zellreihe. Dysplastische Zellen zeigen eine abnormale Morphologie und Funktionen, was zu einer ineffektiven Hämatopoese führt. Das bedeutet, dass trotz einer Überproduktion von Zellen diese nicht vollständig funktionsfähig sind. Ein zentrales Merkmal der CMML ist die persistente Monozytose, welche durch die übermäßige Produktion und Freisetzung von Monozyten aus dem KM in die periphere Blutbahn entsteht.

Die myeloproliferativen Eigenschaften umfassen die Überproduktion von Zellen, insbesondere Monozyten, während die myelodysplastischen Merkmale durch die Dysplasie und ineffektive Hämatopoese gekennzeichnet sind. Zudem spielt die Mikroumgebung des KM eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentwicklung. Veränderungen in der Interaktion zwischen den CMML-Zellen und dem Knochenmark-Stroma fördern das Überleben und die Proliferation der malignen Klone. [8], [15]

Auf molekularer Ebene sind Mutationen in Genen, die für die Regulation der Hämatopoese und der Signaltransduktion verantwortlich sind, von zentraler Bedeutung. Die meisten Patient\*innen mit CMML weisen somatische Mutationen vor allem in den Genen Ten-Eleven-Translokation 2 (*TET2*) (in etwa 60% der Fälle, was die Genexpression beeinflusst und zur malignen Transformation der HSC beiträgt), Serinreicher Spleißfaktor 2 (*SRSF2*) (in etwa 50% der Fälle, betreffen das RNA-Spleißeln und führen zu einer aberranten Spleißung und Genexpression) und Additional Sex Combs Like-1 (*ASXL1*) (in etwa 40% der Fälle, beeinflussen die Chromatinstruktur und Genexpression) auf. Die Kombination von *TET2*- und *SRSF2*-Mutationen wird bei etwa 20% der CMML-Patienten beobachtet. [8], [10] Die Tumorsuppressorgene *TET2* und *ASXL1* kodieren für Proteine, die die epigenetische Regulation von Genen steuern. [16]

Das RAS-Signaling spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Mutationen in den RAS-Genen (insbesondere *NRAS* und *KRAS*) führen zu einer Überaktivierung der Signalkaskade und einem unkontrollierten Zellwachstum, sowie einem längeren Überleben der Zelle, da die Apoptose verhindert wird. Die Mutationen aktivieren nachgeschaltete Signalwege, wie beispielsweise den MAPK/ERK-Weg, welche eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der CMML spielen. [17] RAS-Aktivierungsvarianten wie *KRAS*, *NRAS*, *CBL* und *PTPN11* sind häufig mit einer proliferativen Variante der CMML (MPN-CMML) und einem negativen klinischen Verlauf verbunden. [17], [18]

Eine Zusammenfassung der Genmutationen und deren Häufigkeit findet sich in Tabelle 2. [8]

Tabelle 2 | Relative Häufigkeit in Prozent von somatischen Mutationen bei Patient\*innen mit CMML [8]

Epigenetische Regulierung	<i>TET2</i> (60%), <i>ASXL1</i> (40%), <i>EZH2</i> (5%), <i>DNMT3A</i> (5%), <i>IDH1</i> (1%), <i>IDH2</i> (5%)
Mutationen, die den RAS-Weg aktivieren	<i>JAK2.V617F</i> (10%), <i>CBL</i> (15%), <i>NRAS</i> (15%), <i>KRAS</i> (10%), <i>PTPN11</i> (5%), <i>NF1</i> (<5%), <i>FLT3</i> (<5%)
Spleißen	<i>SRSF2</i> (50%), <i>SF3B1</i> (5-10%), <i>U2AF1</i> (5-10%), <i>ZRSR2</i> (5%)
Transkription / Nukleosomenaufbau	<i>RUNX1</i> (15%), <i>SETBP1</i> (15%), <i>GATA2</i> (5%)
DNA-Schäden	<i>TP53</i> (<1%), <i>PHF6</i> (5%)
Prognostisch relevante Mutationen	<i>NRAS</i> , <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> , <i>SETBP1</i> , <i>SRSF2</i>

Keine dieser Mutationen oder ihre Kombination ist krankheitsspezifisch, da diese Mutationen auch bei anderen myeloischen Neoplasien bzw. auch im Rahmen einer klonalen Hämatopoese mit unbestimmtem Potential auftreten können. Dennoch spielen sie eine Rolle bei der Diagnose und Prognoseabschätzung der CMML. Varianten in *ASXL1* sind ein ungünstiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben. Patient\*innen mit Varianten in *RUNX1* oder *CBL* scheinen ein erhöhtes Risiko für eine AML-Transformation zu haben.[8], [16]

Die häufigsten chromosomalen Aberrationen, die man in den Zellen einer CMML finden kann, sind eine Monosomie des Chromosoms 7 oder eine Deletion 7q. Diese gehen oft mit einer schlechten Prognose einher. Des Weiteren können Trisomien 8, 10, 19 und 21, Deletionen von 5q, 11q und 12p sowie Additionen in 17p und komplexe Karyotypen (drei oder mehr Aberrationen) vorhanden sein.

Diese Anomalien können Hinweise auf die zugrunde liegende Pathogenese der Erkrankung geben und haben prognostische Bedeutung. [8]

Zusammengefasst entsteht die Erkrankung durch genetische und epigenetische Veränderungen, die eine klonale Expansion dysplastischer und proliferativer hämatopoetischer Zellen verursachen. Diese Veränderungen führen zu einer gestörten Hämatopoese, was sich in einer erhöhten Produktion und Freisetzung von Monozyten, einer Dysplasie in der myeloischen Zellreihe und einer erhöhten Proliferation der malignen Klone zeigt und schließlich zur klinischen Manifestation der CMML führt.

#### 1.1.5 THERAPIE

Die Therapie der CMML hängt vom Krankheitsstadium, Alter, Allgemeinzustand der Patient\*innen und den molekularen und genetischen Eigenschaften der Erkrankung ab.

Derzeit stellt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) die einzige kurative Therapie dar. Allerdings kommt sie aufgrund des meist hohen Alters und häufiger Begleiterkrankungen nur für eine Minderheit der Patient\*innen in Frage. Für Patient\*innen mit dysplastischer CMML und Hochrisikokonstellationen, die keine Kandidaten für eine SZT sind, ist das Medikament Azacitidin zugelassen. Es kann bei einem Teil der Patient\*innen zu einem Ansprechen führen. Azacitidin gehört zu den hypomethylierenden Substanzen. Sie wirken, indem sie die DNA-Methylierung verändern, was zu einer Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und einer Hemmung der Zellproliferation führt. Weitere Medikamente sind derzeit noch nicht zugelassen. Bei fortgeschrittener CMML oder bei einer Transformation in eine AML kann eine intensive Chemotherapie erforderlich sein. Diese Behandlung zielt darauf ab, Leukämiezellen zu zerstören und damit die

Symptome zu lindern. Insgesamt stellen sich aber die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten in vielen Fällen als unzureichend dar und neue, alternative Therapiekonzepte sind dringlich erforderlich. [5], [8]

### **Chimäre Antigenrezeptor (CAR) T-Zell Therapie:**

Die CAR-T-Zelltherapie ist eine innovative immunonkologische Behandlungsmethode, bei der körpereigene T-Zellen des/der Patient\*innen genetisch verändert werden, um Krebszellen zu erkennen und anzugreifen. Bei Patient\*innen mit (hochmalignen) B-Zell-Lymphomen, B-zelligen akuten Leukämien oder Multiplen Myelom wird diese Therapie bereits erfolgreich klinisch angewandt.

Hierfür werden T-Zellen aus dem Blut gewonnen und mit Hilfe eines viralen Vektors gentechnisch so modifiziert, dass sie chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR) exprimieren. Dieser Rezeptor besteht aus einem Antikörperfragment, das ein spezifisches Antigen auf den Krebszellen erkennt, sowie aus Signaldomänen, die die T-Zell-Aktivierung und Proliferation steuern. Nach der genetischen Modifikation werden die CAR-T-Zellen den Patient\*innen zurückinfundiert. Sobald sie im Körper des Patienten sind, zirkulieren die CAR-T-Zellen und erkennen die Krebszellen. Dies wird durch spezifische Antigene erreicht, welche auf malignen Zellen vorhanden sind, jedoch nicht in signifikanten Mengen auf normalen HSC. Beim Erkennen der Zielzellen binden die CAR-T-Zellen an diese und setzen zytotoxische Substanzen frei, die die Krebszellen abtöten.

Die Anwendung der CAR-T-Zell-Therapie bei der CMML ist derzeit erst im Stadium intensiver Forschung und Daten von klinischen Studien fehlen noch. Die CMML stellt aufgrund ihrer komplexen und heterogenen Natur besondere Herausforderungen dar. Die Identifikation geeigneter Zielantigene, die spezifisch für CMML-Zellen und nicht für gesunde Zellen sind, ist bislang noch nicht gelungen. [19], [20]

## 2 HYPOTHESE UND ZIEL

Ziel dieser Masterarbeit ist es, neue Oberflächenmarker auf neoplastischen Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen von Patient\*innen mit CMML im Vergleich zu gesunden Zellen zu charakterisieren. Durchflusszytometrische Methoden, die eine qualitative und semiquantitative Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen auf Einzelzellbasis ermöglichen, sollen zu diesem Zweck eingesetzt werden. Zweck dieses Ansatzes ist daher zum einen das Aufzeigen neuer diagnostischer Möglichkeiten bei der CMML und zum anderen die Identifizierung potenzieller Oberflächenantigene, die für eine zielgerichtete Therapie, unter anderem mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern oder CAR T-Zellen, geeignet sein könnten. Insgesamt könnte die Testung neuer Oberflächenmarker auf ihr diagnostisches und therapeutisches Potential helfen, die Diagnosegenauigkeit zu verbessern und mögliche Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie bei der CMML zu liefern.

## 3 MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 MATERIALIEN

#### 3.1.1 PATIENTENPROBEN

Insgesamt wurden 28 Patient\*innen mit CMML und 21 Personen ohne hämatologische Grunderkrankung, von denen Blut- oder Knochenmarkproben nach Einholung einer Einverständniserklärung in der Leukämiezellbank der Biobank der Medizinischen Universität gelagert waren, in diese Studie eingeschlossen. Die dazu vorliegenden klinischen und (zyto-) genetischen Daten zu den einzelnen CMML-Patient\*innen wurden mittels dem elektronischen Dokumentationsprogramm MEDOCS (Medizinisches Dokumentations- und Kommunikationssystem, SAP Deutschland) erhoben. Die Daten wurden pseudonymisiert und in einer Excel-Datei (Microsoft® Excel, Version 16.86) zur weiteren statistischen Analyse gespeichert. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt (EK-Nummer 35-474 ex 22/23) und entsprechend den Vorgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

#### 3.1.2 MATERIALIEN: REAGENZIEREN UND ANTIKÖRPER

- × FACS Tubes 5mL | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- × Falcon 50 ml Polypropylen-Röhrchen | Corning, Berlin, Deutschland

× Sarstedt Inc. Transfer Pipette 3.5ml	Sarstedt AG & Co KG, 51588 Nümbrecht, Deutschland
× Combitips <sup>®</sup> advanced	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
× Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
× Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
× Invicon Termperierbad Zusatz	Invicon diagnostic concepts GmbH, München, Deutschland
× Gibco <sup>™</sup> DPBS ohne Kalzium/Magnesium	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland
× Schaf Serum, USA origin, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
× Natriumazid BioXtra	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich
× FITC IgG1 Mouse Isotype Control	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× FITC CD312 (EMR2) anti-human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland
× FITC CD97 anti-human	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× FITC CD36 anti-human	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× FITC HLA-DR anti-human	BD Biosciences, San Jose, USA
× PE Mouse IgG2a, κ Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, USA
× PE CD64 anti-human	BD Biosciences, San Jose, USA
× PE CD120b	BD Biosciences, San Jose, USA
× PE CD88	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× ECD IgG1 Mouse Isotype Control	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× ECD CD34	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× PerCP/Cy5.5 Mouse IgG2a κ Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, USA

× PerCP/Cy5.5 CD14	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× PerCP/Cy5.5 CD123	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× PECy7 Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, USA
× PECy7 CD38	BD Biosciences, San Jose, USA
× PC7 CD13	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× IgG1 Mouse-APC Isotype Control	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× APC CD191	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× APC CD85d	BD Biosciences, San Jose, USA
× APC C3AR	BioLegend, Inc., San Diego, USA
× APC CD33	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× IgG1 Mouse-AF750 Isotype Control	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× AF750 CD16	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× AF750 CD14	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× PB Mouse IgG2a, κ Isotype Control	BD Biosciences, San Jose, USA
× PB CD15	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× V500C Mouse IgG1 (X40)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
× V500C CD45	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

### 3.1.3 GERÄTE, AUSWERTESOFTWARE

- × Allegra<sup>®</sup> X-15R Zentrifuge | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- × Navios Durchflusszytometer | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- × Kaluza C | Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
- × Graph Pad Prism 10 | GraphPad Software, San Diego, USA
- × Microsoft Excel | Microsoft Corp., Washington, USA

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 HINTERGRUNDINFORMATIONEN ZUR DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) stellt ein Verfahren zur (semi)quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen von Zellen in einer Suspension dar. Dabei werden in einem Durchflusszytometer Einzelzellen mittels eines Laserlichts hinsichtlich ihres Lichtstreuerverhaltens bzw. bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen hinsichtlich ihres emittierten Lichtes mittels Detektoren charakterisiert. Die Streulichtmenge korreliert mit der Größe und Komplexität der Zelle, wie Abb. 2 veranschaulicht.

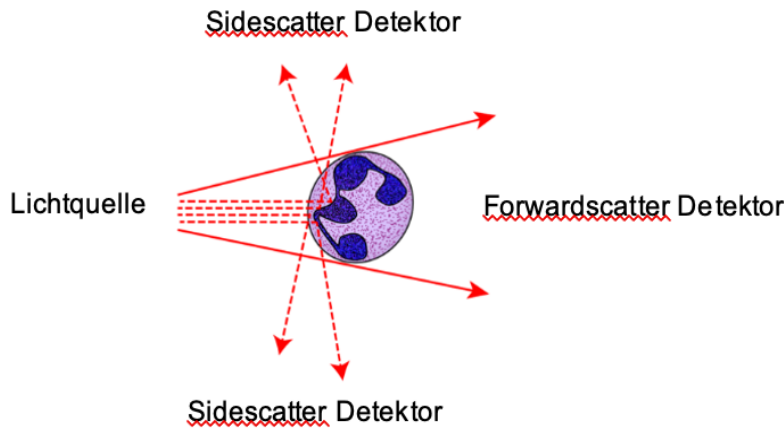


Abb. 2 | Lichteinfall auf einen Granulozyten und dessen Streulichtverhalten

<https://www.learnhaem.com/courses/flow-cytometry/lessons/light-scatter/attachment/light-scatter-neut-01/>

Beispielsweise streuen Granulozyten mit ihrer rauen Oberfläche und den vielen Vesikeln im Inneren deutlich mehr Licht als B- oder T-Lymphozyten deren Oberfläche glatt ist. Das vorwärts gestreute Licht (FSC = Forwardscatter) wird durch eine Zelle im Strömungskanal gebrochen und setzt sich im Lichtweg fort, wo es von einem Sensor im Lichtweg detektiert wird. Der FSC ist daher ein Maß für die Beugung des Lichts unter einem flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Seitlich gestreutes Licht (SSC = Sidescatter) wird von den Zellen in eine Richtung gebrochen, die außerhalb des ursprünglichen Lichtweges liegt und korreliert mit der Oberfläche bzw. Granulierung der Zellen. So ist es möglich unterschiedliche Subgruppen der Leukozyten, nämlich Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander zu unterscheiden.

Ein wesentlicher Teil der FACS-Analyse basiert auf der Antigen-Antikörper Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird und die Darstellung von Proteinen an der Zelloberfläche aber auch intrazellulär ermöglicht. Die Möglichkeit verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig einzusetzen, ist gegeben, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, jedoch über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Zusätzlich wird jeder vom

Durchflusszytometer erfassten Lichtsignal ein eigener Kanal zugeordnet (siehe Abb. 3).

Die Durchflusszytometrie-Daten zeichnen jedes Ereignis unabhängig auf und stellen die Signalintensität des in jedem Kanal erfassten Lichtsignals für jedes Ereignis dar. Die Daten werden typischerweise auf eine von zwei Arten dargestellt: Histogramme zur Messung oder zum Vergleich eines einzelnen Parameters und Punktdiagramme zum Vergleich von zwei oder drei Parametern gleichzeitig in einem Streudiagramm. [21]

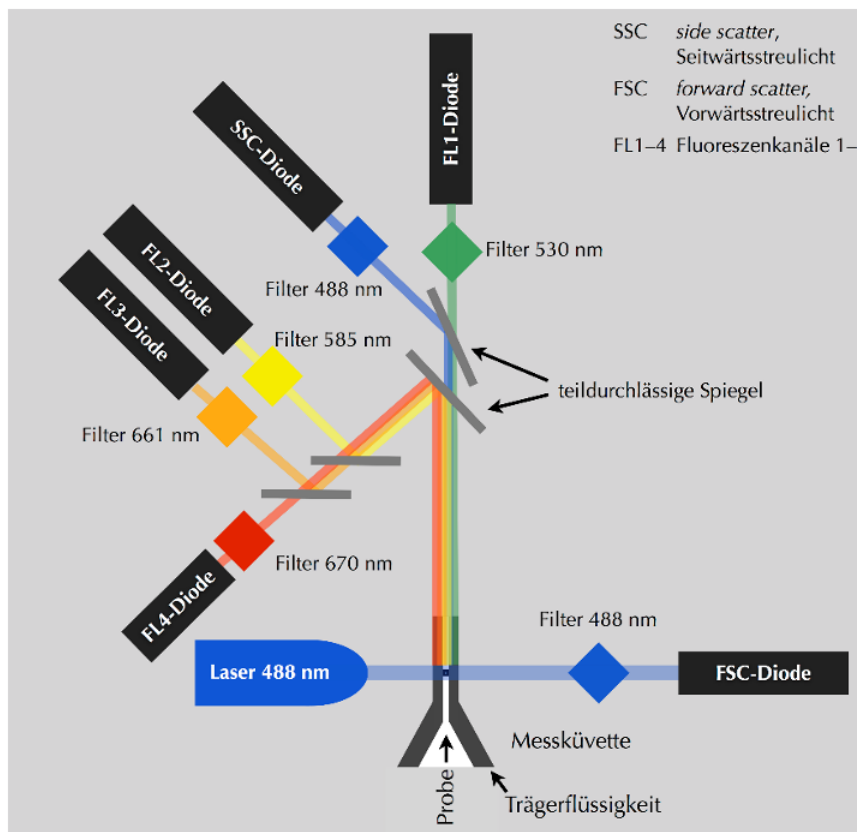


Abb. 3 | Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer basiert auf der Erfassung optischer Eigenschaften einzelner Zellen. Zu diesen optischen Eigenschaften gehören Lichtstreuung und fluoreszierende Antikörpersignale, die bei der Bindung von Antikörpern an ihre entsprechenden Antigene entstehen. Die erfassten optischen Signale werden dann von der Elektronik in digitale Daten zur Anzeige und Analyse umgewandelt.

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Duchflusszytometer.png>

### 3.2.2 HINTERGRUNDINFORMATIONEN ZU DEN CHARAKTERISIERTEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN

**CD312:** CD312 (ADGRE2, EMR2) ist ein Oberflächenprotein, das eine wichtige Rolle bei der Immunfunktion und bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Es gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird vor allem von Zellen des Immunsystems, sowie auf myeloischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. CD312 hat auch wichtige Funktionen bei der Migration und Adhäsion von myeloischen Zellen während der Zelldifferenzierung, -reifung und -aktivierung. [19], [20]

**CD64:** CD64, auch bekannt als Fc-Gamma-Rezeptor (FcγRI), ist ein hochaffiner Rezeptor, der IgG-Antikörper bindet. Er wird hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen und aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimiert. CD64 spielt eine wichtige Rolle bei der Phagozytose und der Immunantwort, indem er die Bindung und Aufnahme von Immunkomplexen vermittelt. Seine Expression kann durch bestimmte Zytokine wie Interferon-Gamma erhöht werden. [22]

**CD120b:** CD120b oder auch Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 (TNFR2) ist in der Lage, verschiedene Signalwege zu aktivieren. Die Funktionen der Signalwege umfassen die Zellaktivierung, Migration und Proliferation sowie die Apoptose. Des Weiteren spielt der Rezeptor eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Funktion regulatorischer T-Zellen. Diese verhindern Gewebeerstörung und Autoimmunerkrankungen, indem sie übermäßige Immunreaktionen dämpfen und die Vermehrung von Effektorzellen und die Zytokinproduktion hemmen. [23]

**CD97:** CD97 gehört zur gleichen Untergruppe von Rezeptoren wie CD312, also aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Allerdings wird es unterschiedlich exprimiert. Es findet sich auf der Zellmembran verschiedener Zelltypen, wie Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und zahlreicher hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zelllinien sowie glatter Muskelzellen. Die Expression von CD97 kann in verschiedenen Krankheitszuständen, einschließlich Entzündungen und Krebs, erhöht sein. [24]

**CD85d:** CD85d, auch bekannt als ILT4 (Immunoglobulin-like transcript 4) oder LILRB2 (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor B2), ist ein inhibitorischer Rezeptor, der hauptsächlich auf myeloischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Er spielt eine Rolle bei der Hemmung der Immunantwort, indem er Signale vermittelt, die die Aktivierung und Funktion von Immunzellen dämpfen. CD85d interagiert mit MHC-Klasse-I-Molekülen und trägt zur Toleranz gegenüber körpereigenen Geweben bei, was Autoimmunreaktionen verhindern kann. [25]

**CD88, C3AR:** CD88 (C5AR) und C3AR sind Rezeptoren des Komplementsystems, die eine Schlüsselrolle bei der Entzündungsreaktion und der Immunantwort spielen. C5AR bindet das Fragment C5a des Komplementsystems und ist auf verschiedenen Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Es vermittelt chemotaktische Signale und trägt zur Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen an Entzündungsstellen bei. C3AR bindet das Fragment C3a und ist ebenfalls an der Chemotaxis und der Regulation der Immunantwort beteiligt, indem es die Zytokinfreisetzung und die Aktivierung von Immunzellen moduliert. [26]

**CD36:** CD36 ist ein Transmembranprotein, das als Rezeptor für eine Vielzahl von Liganden dient, einschließlich oxidierter Lipoproteine und langkettiger Fettsäuren. Es wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter Thrombozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Adipozyten. CD36 spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Fettsäuren, der Phagozytose und der Erkennung von oxidiertem LDL, was es zu einem wichtigen Akteur bei der Atherosklerose macht. Seine Dysfunktion ist mit metabolischen Erkrankungen wie Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen verbunden. [27]

**CD33:** CD33 kommt hauptsächlich auf myeloischen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vor. Es handelt sich um ein Sialinsäure-bindendes Immunglobulin-ähnliches Lektin (Siglec) das eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und der Regulation der Immunantwort spielt. CD33 ist auch als Zielmolekül in der Therapie bestimmter myeloischer Leukämien bekannt, da seine Expression auf myeloischen Vorläuferzellen erhöht ist. Die Blockierung oder

Modulation von CD33 kann therapeutisch genutzt werden, um das Wachstum von Leukämiezellen zu hemmen. [28]

**CD13:** CD13, auch bekannt als Aminopeptidase N, ist ein Oberflächenenzym, das an der Spaltung von N-terminalen Aminosäuren aus Peptiden beteiligt ist. Es wird auf einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, darunter Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und myeloischen Zellen. CD13 spielt eine Rolle in der Regulation von biologischen Prozessen wie Zellmigration, Differenzierung und Angiogenese. Seine Expression wird in der Diagnostik bestimmter Leukämien und anderer myeloischer Erkrankungen genutzt. [29]

**CD191:** CD191 (Chemokin-Rezeptor 1, CCR1) ist ein Rezeptor, der auf der Oberfläche von Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und T-Zellen exprimiert wird. Er bindet verschiedene Chemokine, die bei vielen Krebsarten an der Aufrechterhaltung der Mikroumgebung des Tumors beteiligt sind und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Migration und Aktivierung von Immunzellen im Rahmen der Immunantwort. CD191 ist an Entzündungsprozessen beteiligt und wird mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. [30]

### 3.2.3 GENETISCHE CHARAKTERISIERUNG DER CMML-PROBEN MITTELS NEXT GENERATION SEQUENCING

Die genetische Charakterisierung der CMML-Proben wurde im Rahmen der klinischen Routine am Institut für Molekularpathologie, an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Die dorthin eingesandten Proben wurden mit NGS mittels Ion-Torrent-Technologie und einem Ampliseq Panel für myeloische Neoplasien, das entweder mutierte Hotspot-Regionen in den Genen (*NPM1*, *ASXL1*, *BRAF*, *CALR*, *CBL*, *CSF3R*, *CXCR4*, *ETNK1*, *EZH2*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*,

*STAT3, STATSB, TETZ, U2AF1* und *WT1*) oder die gesamte kodierende Region in den Genen (*ANKRD26, BCOR, CEBPA, DDX41, DNMT3a, ELANE, ETV6, GATA2, HAX1, NF1, PHF6, PIGA, SF3B2, SFRP1, SRP72, STAG2, TP53, ZRSR2*) umfasst, untersucht.

Ion Torrent ist eine Art der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung. Die Ion Torrent Sequenzierung nutzt die Halbleitertechnologie, um die Freisetzung von Wasserstoffionen zu detektieren, die bei der DNA-Polymerisation freigesetzt werden. Daher kann auf fluoreszierende Farbstoffe verzichtet werden. Wenn ein Nukleotid in einen DNA-Strang eingebaut wird, wird ein Wasserstoffion freigesetzt. Dieses Ion verändert den pH-Wert der Umgebung, was von einem Halbleiterchip gemessen wird. Jede Veränderung im pH-Wert entspricht der Bindung eines bestimmten Nukleotids, wodurch die DNA-Sequenz ermittelt werden kann.

Vor der eigentlichen Sequenzierung müssen die DNA-Proben amplifiziert werden, um eine ausreichende Menge an Material zu erhalten. Dies geschieht bei der Ion-Torrent-Sequenzierung durch die Emulsions-PCR, eine spezielle Form der PCR, die in einer Öl-Wasser-Emulsion durchgeführt wird. In der Regel erfolgt eine Sequenzierung in folgenden Schritten:

- × Library Preparation: Die zu sequenzierende DNA wird in kleine Fragmente zerlegt.
- × Adapterligierung: Spezifische Adaptersequenzen werden an die Enden der DNA-Fragmente ligiert, um eine Bindung an die Beads zu ermöglichen.
- × Emulsionsbildung: Die DNA-Fragmente werden zusammen mit den Beads in eine Öl-Wasser-Emulsion eingebracht. Jedes Emulsionströpfchen enthält idealerweise ein DNA-Fragment und ein Bead.
- × PCR-Amplifikation: Innerhalb der Emulsionströpfchen wird die PCR durchgeführt. Da jedes Tröpfchen isoliert ist, wird jedes DNA-Fragment unabhängig amplifiziert, wodurch eine Vielzahl von Kopien auf den Beads entsteht.

Nach der Emulions-PCR werden die beladenen Beads auf einen Ion Torrent Chip geladen. Der Chip enthält Millionen winziger Wells, die jeweils ein Bead und Polymerase-Mischung enthalten. Nun beginnt die Sequenzierung und Nukleotide werden nacheinander über den Chip gespült, wenn ein Nukleotid in die DNA-Sequenz eingebaut wird, wird ein Wasserstoffion freigesetzt und die DNA-Sequenz kann wie vorher beschrieben, bestimmt werden. [31], [32]

### 3.3 PROBENAUFBEREITUNG

#### **Aufbereitung für Biobank:**

Um die mononukleäre Zellschicht (MNC) gezielt zu isolieren wurde ein standardisiertes Verfahren zur Herstellung eines FICOLL verwendet. Zur Isolierung der Zellschicht wurden 15mL Lymphoprep (Stemcell Technologies) in ein 50mL Falcon vorgelegt. Die gewonnenen KM- und PB-Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit DPBS auf 35mL verdünnt. Nun wurden die verdünnten Proben langsam, sodass es zu keiner Vermischung des Lymphoprep und der verdünnten Probe kommt, überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 1500g und 4°C ohne Bremse. Nach der Auftrennung der Zellen durch die Zentrifugation wurde die MNC-Schicht vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgehoben und in ein neues Falcon überführt. Die Zellen wurden auf 50mL DPBS aufgefüllt und erneut bei 4°C und 1500g für fünf Minuten zentrifugiert, um das zelltoxische Lymphoprep auszuwaschen. Nach der Resuspension des Zellpellets wurden die Zellen gezählt und aliquotiert, um eine genaue Zellzahl pro Cryovial zu gewährleisten. Die MNC wurden mit RPMI, 10% DMSO und 10% FBS als Gefriermedium bis zur weiteren Verwendung im Lager der Biobank bei -170°C im flüssigen Stickstoff gelagert.

## Aufbereitung der Proben für die durchflusszytometrische Analyse:

Vor der Probenaufbereitung wurden die gefrorenen Proben aus dem Lager der Biobank entnommen und in der Biobank-Datenbank entsprechend als Entnahme registriert. Die Proben wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 30mL DPBS resuspendiert, bis sich die Zellen fast vollständig lösten. Danach folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 364g. Der Überstand wurde dekantiert und das verbleibende MNC-Pellet mit 1100µL DPBS resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurden drei Tropfen Schafserum, versetzt mit 0,1% Natriumazid pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation für 7 Minuten bei 4°C im Kühlschrank, denn durch die Blockierung mit Schafserum kann eine unspezifische Antikörperbindungen verhindert werden. Während der Inkubation wurde in den FACS-Tubes die gewünschte Antikörper Mastermix Menge laut Pipettierschema, ersichtlich in Tabelle 3, vorgelegt. Folgende Oberflächenmarker wurden mittels harmonisierter, durchflusszytometrische Analyse untersucht: CD312, CD64, CD120b, CD97, CD85d, CD88, C3AR, CD36, CD33, CD13, CD191. Bezüglich Expression auf Monozyten wurden alle Marker analysiert, für CD34<sup>+</sup> Blasten wurden CD312, CD120b, CD97, CD85d, CD88 und C3AR gemessen, da in der Kontrollgruppe die anderen Marker nicht zur Verfügung standen. CD34, CD117 und CD45 wurden als Backbone-Marker verwendet. CD312 und C3AR werden in der Literatur auch als potenzielle Ziele für CAR-T-Zellen genannt. Isotypenkontrollen und Nativkontrollen für Autofluoreszenz wurden ebenfalls in die Messungen einbezogen.

Tabelle 3 | Antikörper Pipettierschema

	FITC	µL	PE	µL	ECD	µL	Per-CPcy5	µL	PECy7	µL	APC	µL	A-AF75	µL	PB	µL	V500C	µL
IgG	IgG1	5	IgG2a	3	IgG1	5	IgG2a	3	IgG1	3	IgG1	3	IgG1	3	IgG2a	7	IgG1	2,5
Nativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mono 1	CD 312	3	CD 64	5	CD 34	5	CD 14	3	CD 38	3	CD 191	3	CD16	3			CD 45	2,5
Mono 2	CD 97	3	CD 120B	3	CD 34	5	CD 14	3	CD 38	3	CD 85d	3	CD16	3			CD 45	2,5
Mono 3	CD 36	5	CD 88	3	CD 34	5	CD 14	3	CD 38	3	C3AR	3	CD16	3			CD 45	2,5
Mono 5	HLA-DR	5	CD 117	5	CD 34	5	CD 123 (PC3)	5	CD 13 (PCT)	3	CD33	3	CD 14	3	CD 15	7	CD 45	2,5

Für die Färbung wurden 100µL Zellprobe in das Tube für die Isotypenkontrolle und die Nativkontrolle pipettiert. 200µL der Zellsuspension wurden für die Antikörperfärbung pro Tube pipettiert. Nachdem die Zell-Antikörpermischung

gevoertext wurde, erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 17 Minuten im Dunkeln, um die lichtempfindlichen Antikörper nicht zu schwächen. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 3mL DPBS und einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 364g. Die Zellpellets wurden mit 200µL DPBS in den Tubes für Isotypen- und Nativkontrolle und 300µL in den Antikörper-Tubes resuspendiert. Bis zur Analyse, die innerhalb einer Stunde stattfand, verweilten die fertig vorbereiteten Proben im Kühlschrank im Dunklen bei 4°C.

### 3.3.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der Navios Durchflusszytometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) zur Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression in den CMML- und Normalproben eingesetzt. Die Einstellungen und Kompensationswerte wurden für alle verwendeten Farbstoffe laut Vorschrift durchgeführt. Auch der Flow-Check zur täglichen Überprüfung der optischen Ausrichtung und des Fluidiksystems des Navios Durchflusszytometer für die Qualitätsüberprüfung und die Standardisierung wurde vor den Messungen durchgeführt. Mit einer vorschriftsgemäßen und standardisierten Geräteeinstellung kann sichergestellt werden, dass die Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander vergleichbar sind. Für die Messung wurden für jedes Antikörperpanel  $5 \times 10^4$  Zellen am Durchflusszytometer aufgenommen. Um die Expression von Oberflächenmarker zuverlässig zu bestimmen, wurde nach Anwendung der harmonisierten durchflusszytometrischen Analyse, wie zuvor beschrieben eine entsprechende Gating-Strategie festgelegt. Entsprechende Isotypenkontrollen dienten als Negativkontrollen und die Gates der Positivpopulationen wurden für jeden verwendeten Antikörper so eingestellt, dass sie maximal 1% negative Zellen enthielten. In Abb. 4 ist die Einteilung der positiven und negativen Zellen beispielhaft für verwendete Oberflächenmarker (FITC: CD312, CD97 | APC: CD191, C3AR | PE: CD88 | PECy7: CD13) zu sehen.

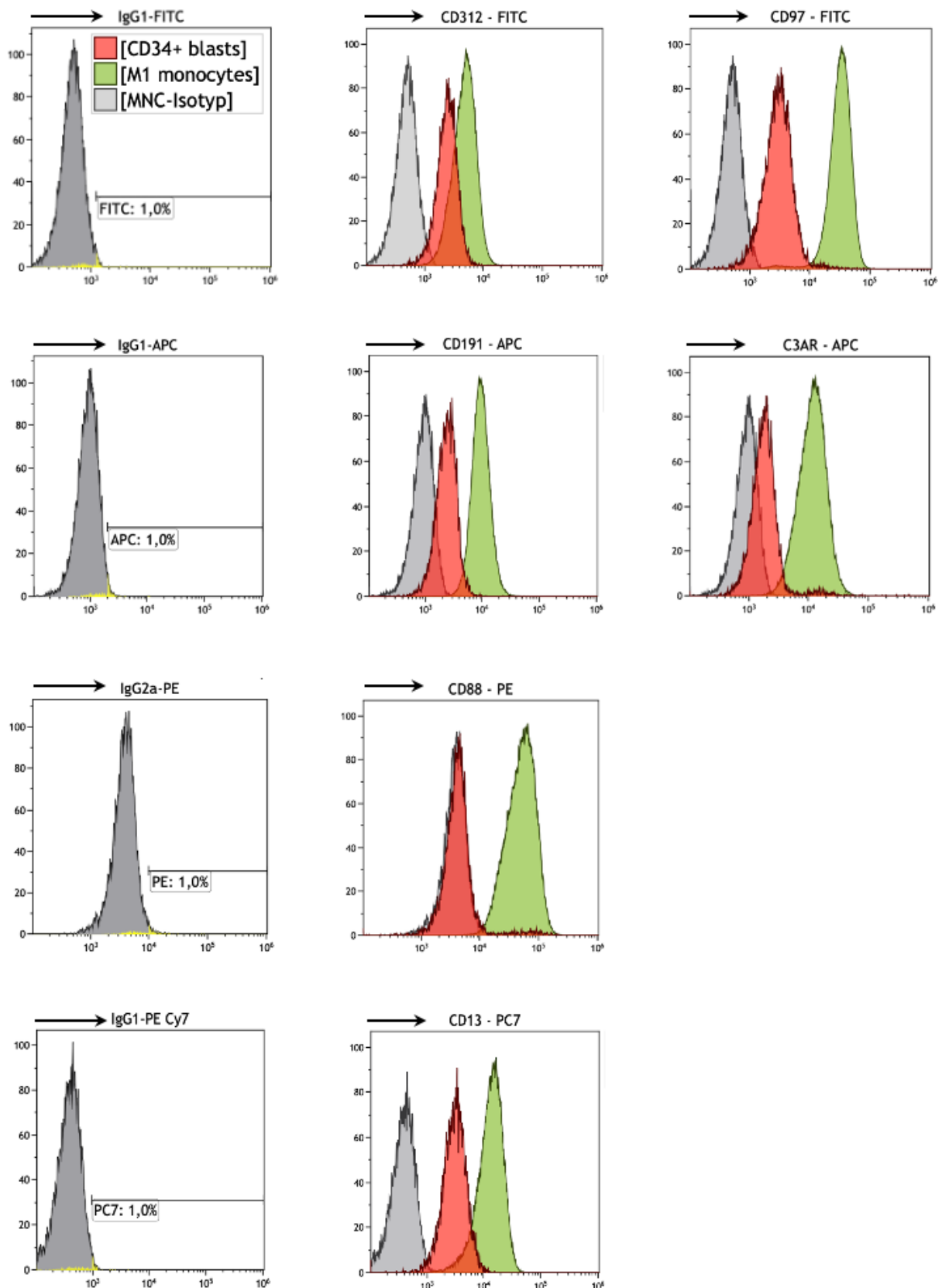


Abb. 4 | Prozent-positiver Anteil Gating Strategie

Auf dem Isotypen-Histogramm sieht man die Einstellung der Isotypenkontrolle auf 1% negative Zellen. Im Overlay erkennt man den Prozent-positiven Anteil der CD34<sup>+</sup> Blasten und Monozyten. IgG1 FITC, CD312, CD97 | APC: CD191, C3AR | PE: CD88 | PECy7: CD13

Die Gating-Strategie zur Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen (insbesondere der Monozyten und der Blasten) ist in Abb. 5 dargestellt. Weiters beinhaltet die Gating-Strategie den Ausschluss von Zelldebris durch den FSC und den SSC. In einem weiteren Gate werden mögliche Dupletten ausgegrenzt. Durch geringe CD 45-Expression und geringe SSC konnten leukämische Blasten identifiziert werden. Die Monozyten- und Lymphozytenpopulationen wurden als Populationen mit hoher CD45-Expression und SSC intermediär bzw. niedriger SSC eingestuft. So können alle nachfolgenden Dotplots oder Histogramme auf die gewünschte Zellpopulation, hier MNC, eingestellt werden.

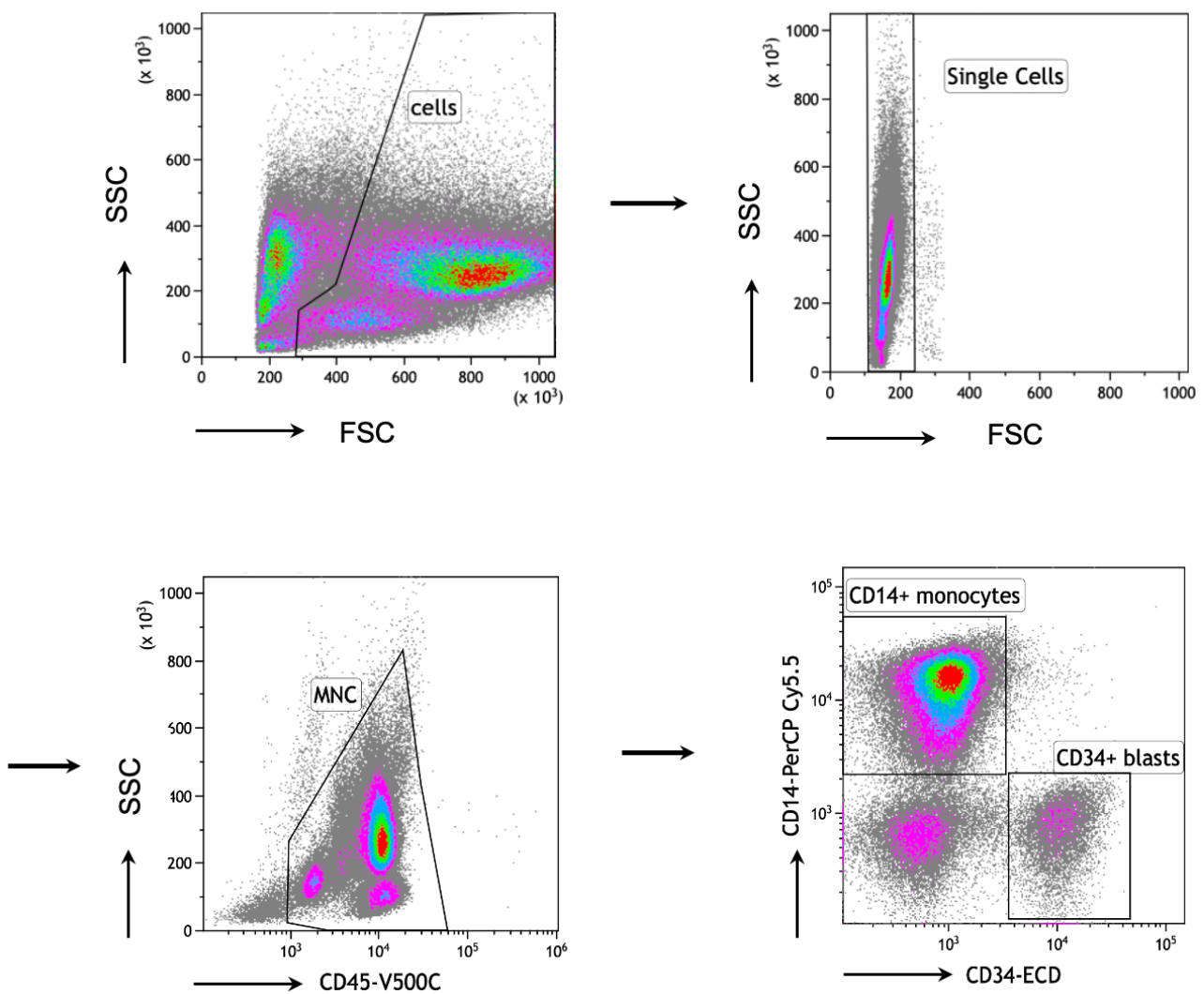


Abb. 5 | Ausschluss von Zelldeprit → Ausschluss von Dupletten → Gating der Monozyten und Lymphozyten → Gating der einzelnen Subpopulationen in MNC

### 3.3.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für jedes gemessene Oberflächenantigen wurde der Anteil an positiven Zellen in Prozent, als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) erhoben. In der Durchflusszytometrie wird die MFI verwendet, um die Expression von Fluoreszenz-markierten Antikörpern auf der Zelloberfläche zu quantifizieren. Der Wert gibt an, wie stark die Zellen im Durchschnitt fluoreszieren, was Rückschlüsse auf die Menge des Zielmoleküls an der Zelloberfläche ermöglicht. Hier wurde die MFI verwendet, um die Expression von den Zielmolekülen zwischen verschiedenen Proben oder Behandlungsgruppen zu vergleichen. Um die Daten zu standardisieren und statistisch auswerten zu können, wurde das Verhältnis (MFI-Ratio) der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität des Oberflächenmarkers und der entsprechenden geometrischen mittleren Fluoreszenz der Isotypkontrolle berechnet.

Für die statistische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Die Unterschiede in den Patientencharakteristika, also der Vergleich zwischen den CMML- und Normalproben oder genetisch definierten CMML-Subgruppen hinsichtlich der MFI-Werte wurde mit dem Mann-Whitney-Test berechnet, da das MFI-Verhältnis der Oberflächenmarker nicht normalverteilt ist. Die Hypothese wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% angegeben, also ein p-Wert kleiner als 0,05 gilt als signifikant.

## 4 RESULTATE

### 4.1 PATIENTENCHARAKTERISTIK

Es standen Proben von 11 Frauen und 17 Männern (Verhältnis 1:1,5) im Alter zwischen 42 und 89 Jahren zur Verfügung, wobei das durchschnittliche Alter 72 Jahre betrug. Bei den Proben handelte es sich um eingefrorene MNC-Proben, darunter fünf Proben aus dem KM und 23 aus dem PB. Bei den Kontrollproben handelte es sich um 13 PB- und 8 KM-Proben von Erwachsenen, die zum Zeitpunkt der Abnahme keinen Hinweis auf eine hämatologische Systemerkrankung mit Befall des Knochenmarks aufwiesen. Auf diese Weise konnten die unterschiedlichen Markerexpressionen zwischen gesunden Monozyten bzw. Stamm- und Vorläuferzellen und neoplastischen Zellen von CMML-Patienten verglichen werden.

### 4.2 VERTEILUNG VON M1- UND M2-MONOZYTEN IN CMML- BZW. NORMALPROBEN

Da eine Erhöhung der klassischen Monozyten mit CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> Phänotyp (Cut-off 94%) hochspezifisch und sensitiv für das Vorliegen einer CMML ist [12], wurden in einem ersten Schritt die Proben hinsichtlich ihres Anteils an M1-Monozyten Phänotyp analysiert. Wie beispielhaft in Abb. 6 zu sehen ist, wurden die M1- und M2 Monozytenpopulationen entsprechend gegatet und der M1- bzw. M2- Monozytenanteil in Prozent im Verhältnis zu den Gesamtmonozyten berechnet.

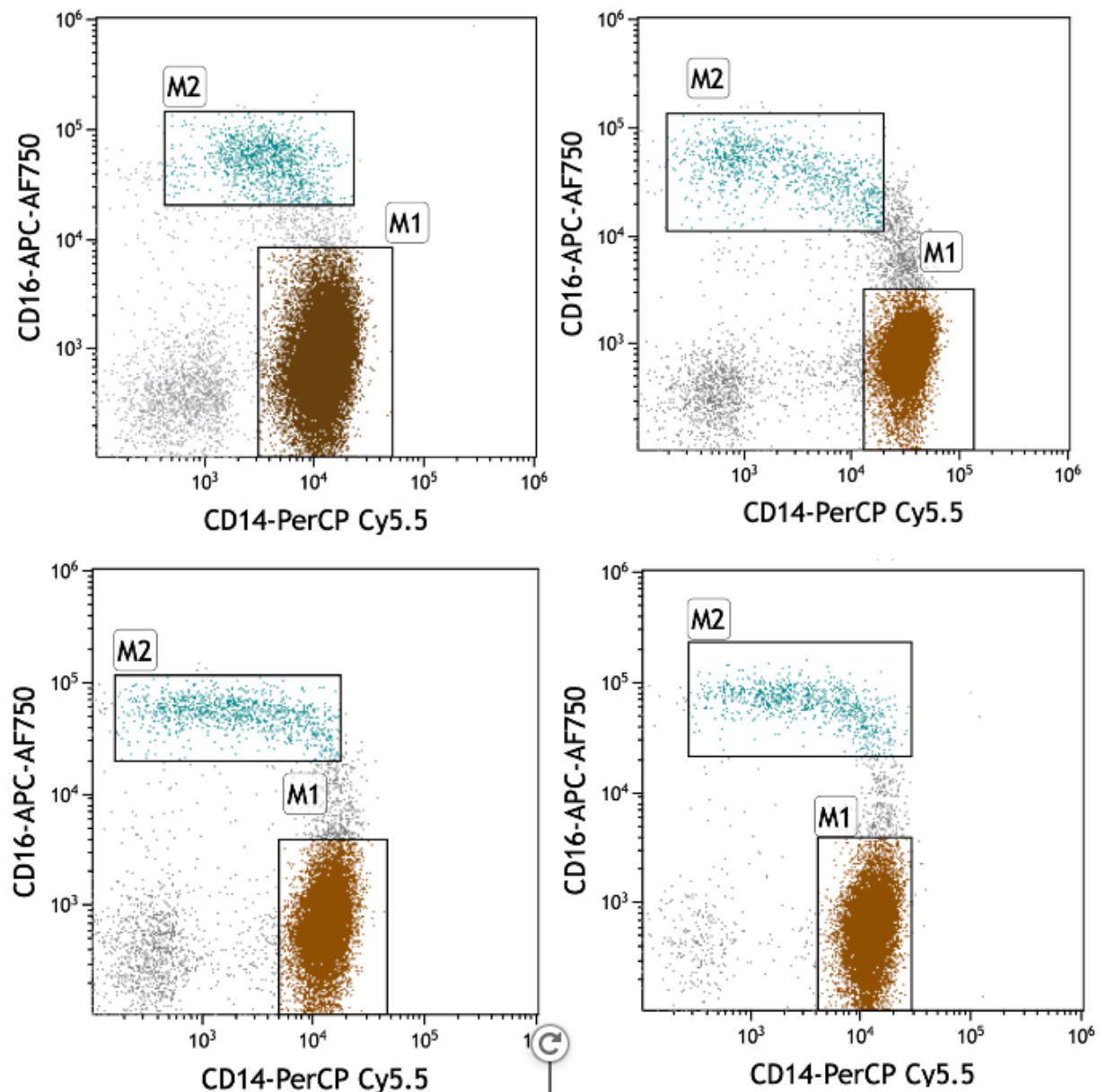


Abb. 6 | Gating von M1 Monozyten und M2 Monozyten, beispielhaft gezeigt bei zwei CMML Proben (obere Reihe) und zwei Normalproben (untere Reihe) zur Berechnung des M1 / M2 Verhältnis

Sechszwanzig von 28 CMML-Proben zeigten >94% klassischer Monozyten vom M1-Phänotyp (CD14<sup>+</sup>, 16<sup>-</sup>; siehe Tabelle). Bei den zwei Proben, die weniger als 94% M1-Monozyten zeigten, handelte es sich um Proben mit bereits fortgeschrittener CMML (in akzelerierter Phase und mit einem erhöhten Blastenanteil). Bei den Normalproben hingegen, in Tabelle aufgelistet, war der Anteil an M1-Monozyten immer unter den Cut-off von <94% und der Anteil der M2-Monozyten immer >5%.

Abb. 7 zeigt das Verhältnis von den M1 zu M2 Monozyten zusammengefasst bei allen verwendeten CMML-Proben und der Kontrollgruppe. Bei den CMML-Proben fanden sich im Durchschnitt 98,2% M1 Monozyten und 1,8% M2 Monozyten, wohingegen in der Kontrollgruppe 89,6% M1 Monozyten und 10,4% M2 Monozyten vorlagen.

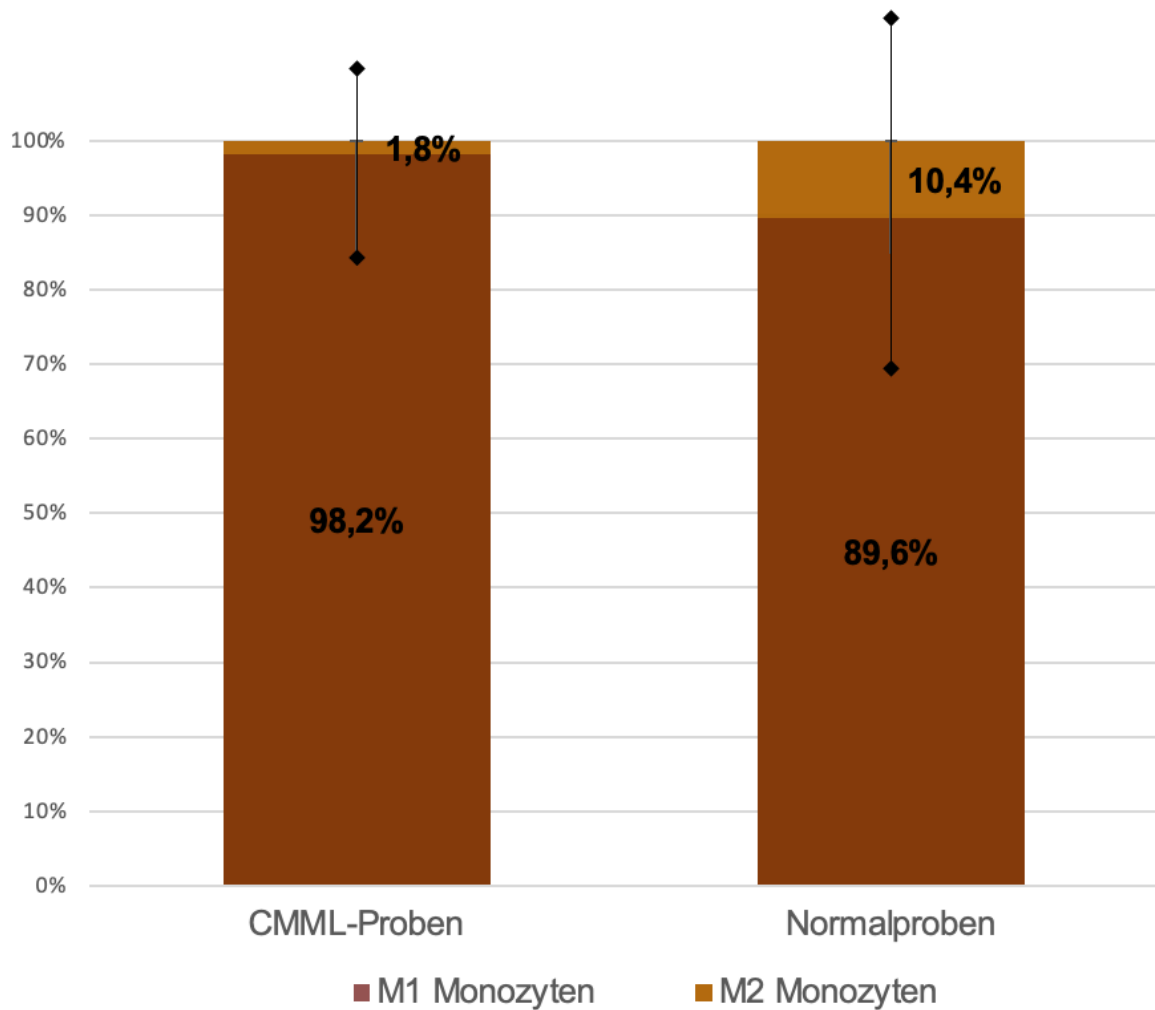


Abb. 7 | Prozentualer Anteil (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) von M1 / M2 Monozyten in CMML- und Normalproben.

Tabelle 4 | Prozentanteil M1- und M2-Monozyten der einzelnen CMML-Proben

Biobanknr.	% M1-Anteil	% M2-Anteil
7050	99,6	0,4
7232	98,4	1,6
7839	99,5	0,5
7852	99,6	0,4
8843	99,9	0,1
8849	96,7	3,3
8877	99,8	0,2
9016	99,5	0,5
9047	98,6	1,4
9076	99,5	0,5
9276	98,7	1,3
9299	100,0	0,0
9346	95,6	4,4
9364	96,7	3,3
9465	97,0	3,0
9467	99,3	0,7
9624	91,1	8,9
9677	96,5	3,5
9727	98,8	1,2
9741	99,2	0,8
9743	95,9	4,1
9748	96,0	4,0
9886	99,4	0,6
10057	98,7	1,3
10194	87,2	12,8
10216	98,9	1,1
10241	97,3	2,7
10287	95,4	4,6

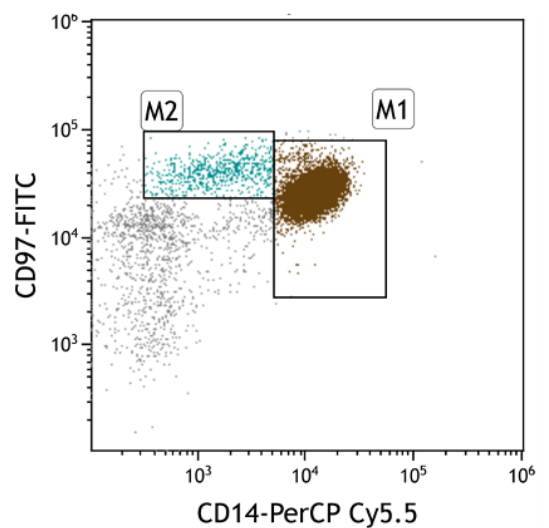
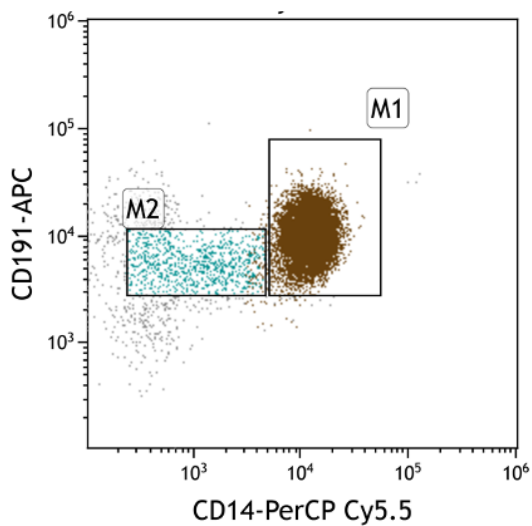
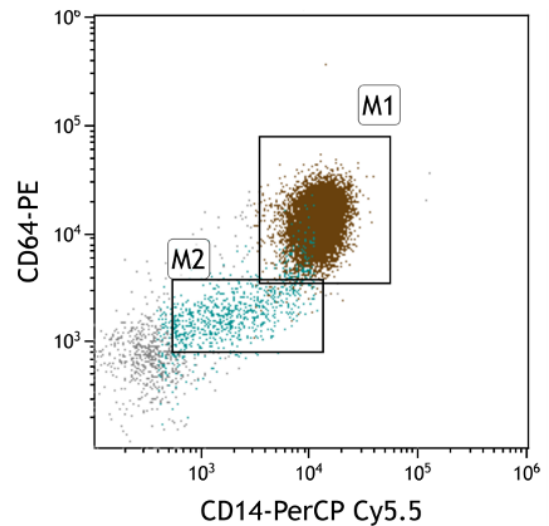
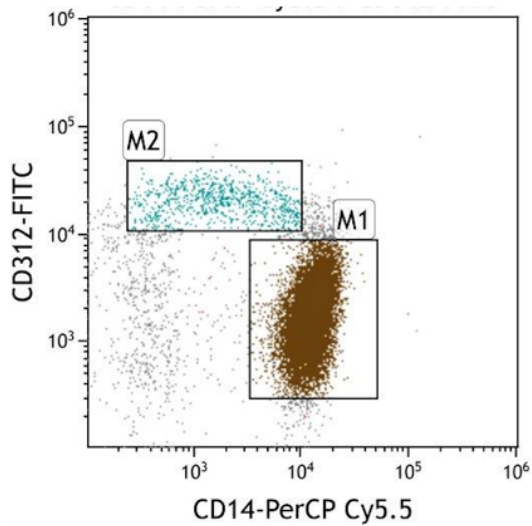
Tabelle 5 | Prozentanteil M1- und M2-Monozyten der einzelnen Normalproben

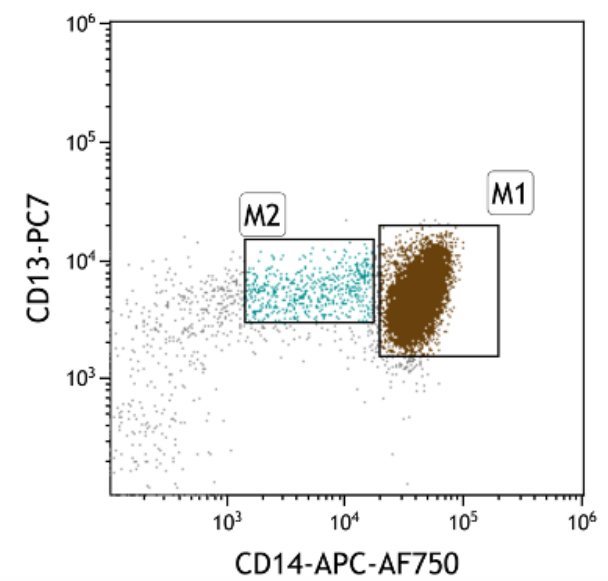
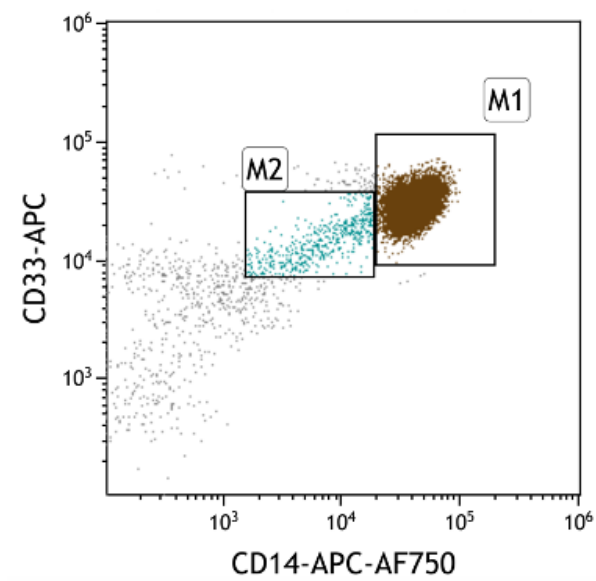
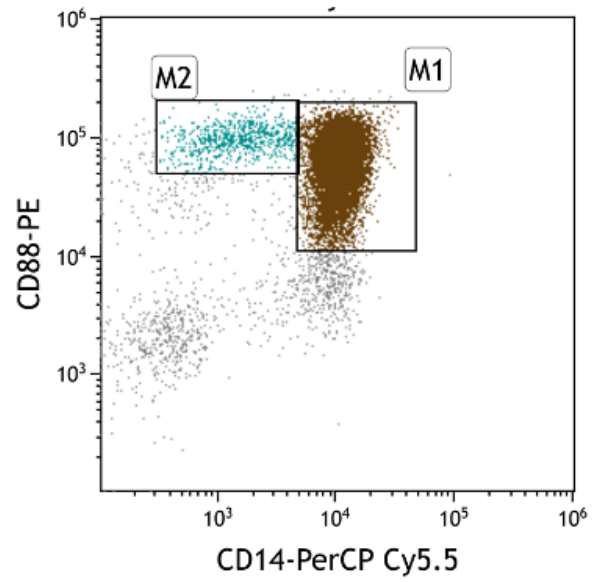
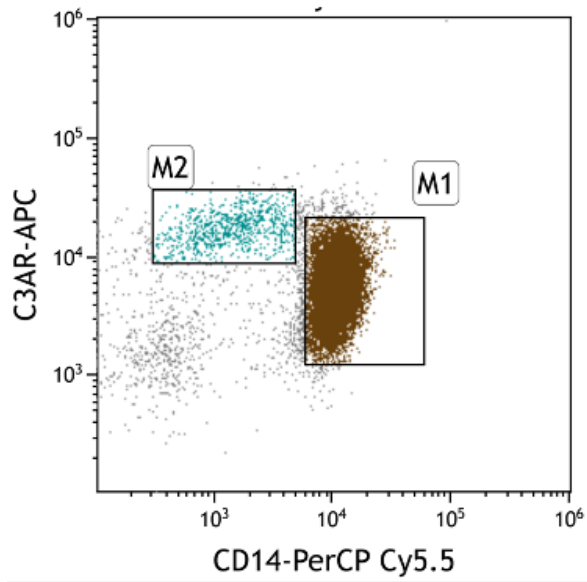
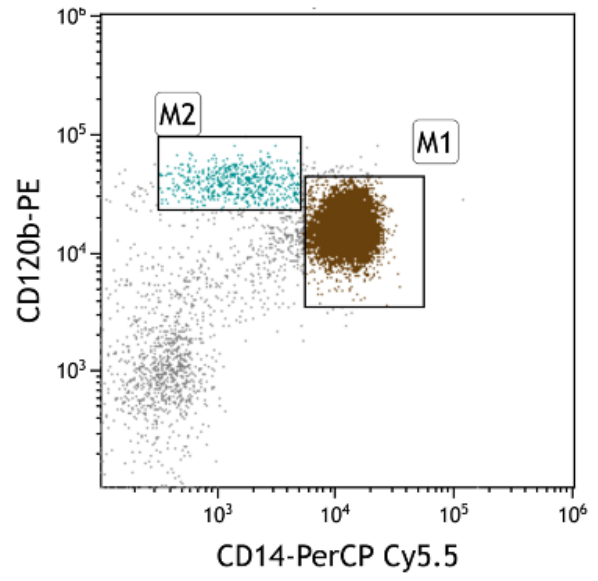
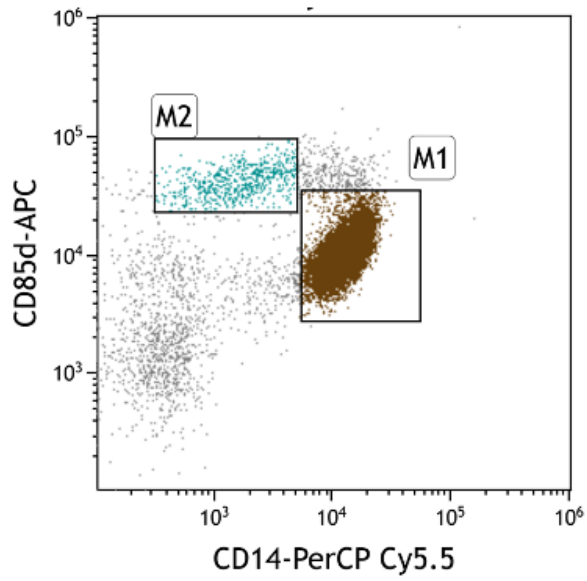
Nummer	% M1-Anteil	% M2-Anteil
1	87,4	12,6
2	93,1	6,9
3	83,6	16,4
4	93,1	6,9
5	88,4	11,6
6	94,3	5,7
7	87,3	12,7
8	87,8	12,2
9	85,7	14,3
10	92,8	7,2
11	84,0	16,0
12	93,6	6,4
13	93,9	6,1

### 4.3 MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NORMALEN M1- UND M2-MONOZYTEN

Da die beiden Subpopulationen der Monozyten wichtig für das Verständnis der unterschiedlichen Rollen von Monozyten in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen sind, interessierte uns als nächstes die Expression der ausgewählten Oberflächenmarker in den beiden Subpopulationen. Entsprechend

wurden die Marker in normalen M1-klassischen Monozyten im Vergleich zu M2-inflammatorischen Monozyten analysiert. In Abb. 8 sind die entsprechenden FACS-Plots zur Expression der verschiedenen Oberflächenmarker in M1- und M2-Monozyten einer Normalprobe zu sehen.





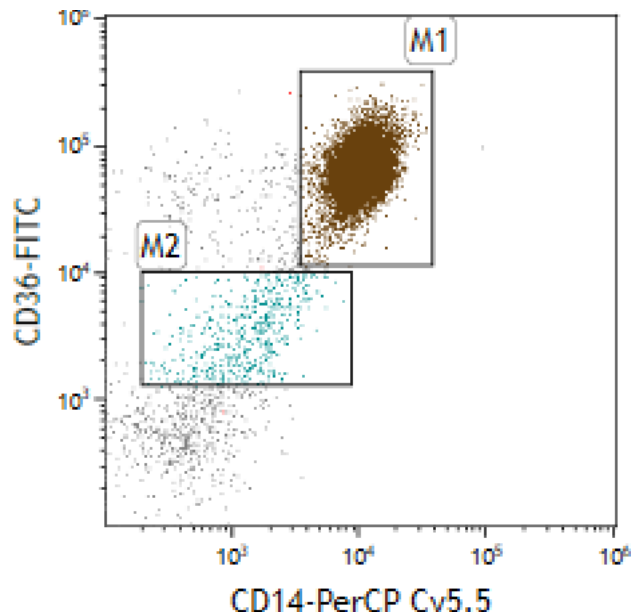


Abb. 8 | Gegenüberstellung aller verwendeter Oberflächenmarker zur Differenzierung von M1 und M2 Monozyten.

In Abb. 9 ist die Expression (als mittlere MFI-Ratio) der einzelnen Marker im Vergleich von M1- und M2-Monozyten dargestellt. Es zeigte sich eine hochsignifikant höhere Expression von CD312 ( $p < 0,0001$ ), CD85d ( $p < 0,0001$ ), C3AR ( $p < 0,0001$ ), und CD88 ( $p < 0,0001$ ) in M2-Monozyten. CD64 ( $p < 0,0001$ ), CD36 ( $p < 0,0001$ ), CD97 ( $p = 0,0295$ ) und CD 33 ( $p = 0,0102$ ) waren in M2-Monozyten im Vergleich zu M1-Monozyten signifikant geringer exprimiert. CD97, CD191 und CD13 zeigten keine unterschiedliche Expression in den M1- im Vergleich zu den M2-Monozyten.

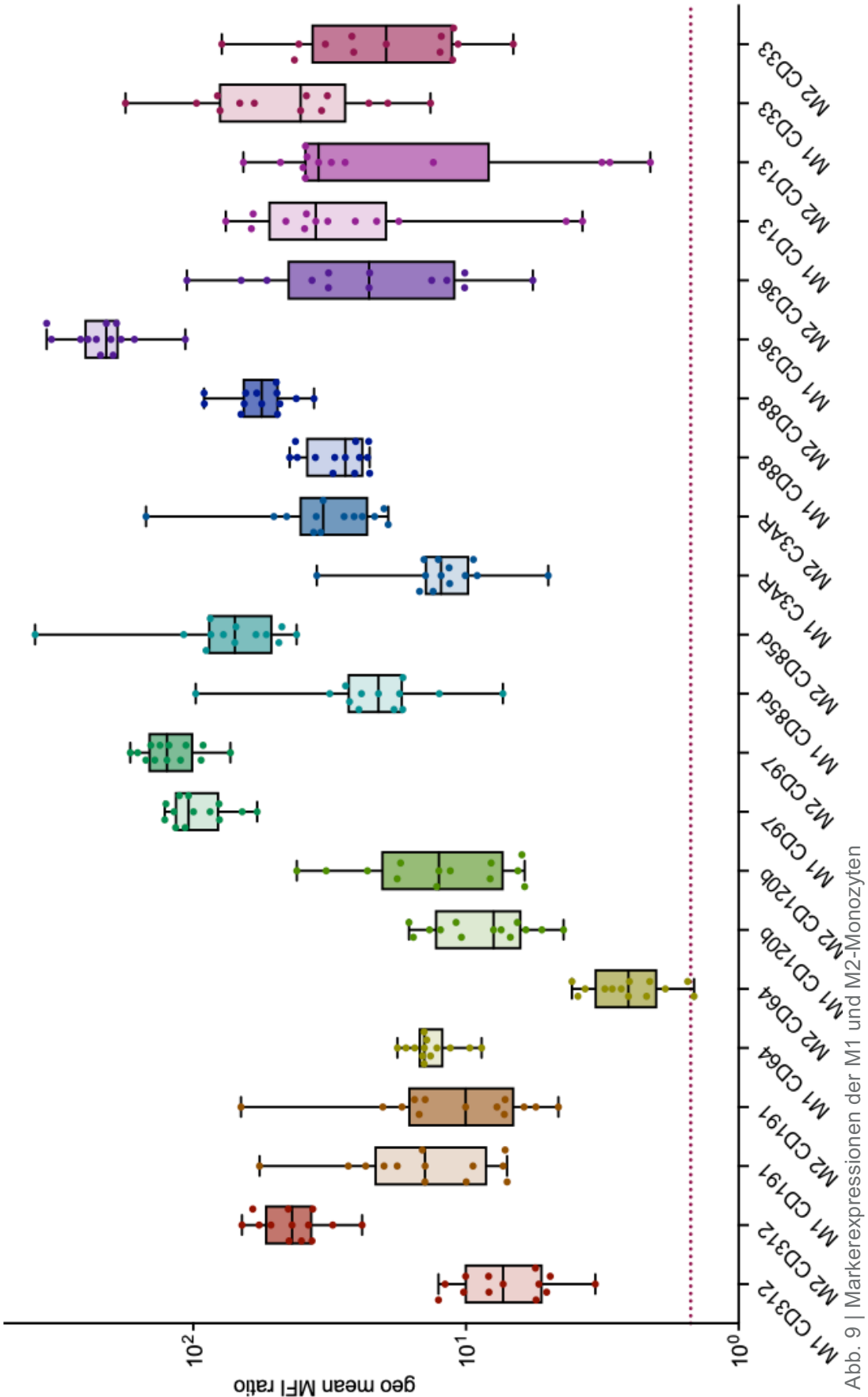


Abb. 9 | Markerexpressionen der M1 und M2-Monozyten

Hier lässt sich gut erkennen, dass die Marker CD312 ( $p < 0,0001$ ), CD64 ( $p < 0,0001$ ), CD85d ( $p < 0,0001$ ), C3AR ( $p < 0,0001$ ), CD88 ( $p < 0,0001$ ) und CD36 ( $p < 0,0001$ ) höher exprimiert wurden.

#### 4.4 MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NEOPLASTISCHEN MONOZYTEN UND CD34<sup>+</sup> BLASTEN VON CMML-PATIENT\*INNEN

Als nächstes wurde die Expression von den insgesamt 11 Oberflächenmarkern (CD312, CD64, CD120b, CD97, CD85d, CD88, C3AR, CD36, CD33, CD13, CD191) auf CD34<sup>+</sup> Blasten und Monozyten bei CMML-Proben analysiert. Da bei den CMML-Proben die M1-Subpopulation unter den Monozyten absolut dominiert, wurde nur diese Subpopulation in weiterer Folge in den CMML- als auch Normalproben herangezogen. Für die Expressionsanalyse der Marker in den Monozyten konnten alle zur Verfügung stehenden Proben (28 CMML-Proben und 13 PB- sowie 8 BM-Normalproben) verwendet werden. Bei der Analyse der CD34<sup>+</sup> Blasten mussten 5 Proben von den 28 CMML-Proben aufgrund zu weniger CD34<sup>+</sup> Blasten (<0.1%), ausgeschlossen werden.

Für die Analyse der physiologischen CD34<sup>+</sup> Zellen wurden nur die acht BM-Normalproben verwendet, da im gesunden peripheren Blut nur <0,1% CD34-positive Stamm- und Vorläuferzellen zu finden sind. Zur Bestimmung der Expression der jeweiligen Marker wurde das MFI-Verhältnis (MFI-Ratio), also der mit dem jeweiligen Antikörper gemessene geometrische MFI-Wert der Probe dividiert durch den MFI-Wert der jeweiligen Isotyp-Kontrolle, ermittelt und Werte >1,5 als signifikante Expression des jeweiligen Markers (entspricht der in den Abbildungen eingefügten roten Linie) angesehen.

Der durchschnittliche Anteil der CD14<sup>+</sup> M1-Monozyten an der Gesamtzahl der mononukleären Leukozyten in den CMML-Proben betrug 59,1% und lag zwischen 20,9% und 92,6%. In den Normalproben fanden sich durchschnittlich 28,4% Monozyten vom CD14-positiven M1-Phänotyp (Bereich 10,5 bis 54,6%, ebenfalls berechnet auf die Gesamtzahlen der mononukleären Leukozyten).

In Abb. 10 ist nun die Expression der analysierten Marker auf Monozyten im Vergleich zwischen CMML-Proben und der Kontrollgruppe dargestellt. Der einzige signifikant unterschiedlich exprimierte Marker in Monozyten zwischen CMML- und Normalproben war CD33. Hier beträgt die mittlere MFI-Ratio in den Monozyten der CMML-Proben 70,27 vs. 35,25 in den Normalproben ( $p= 0,0108$ , siehe auch Abb. 11). Interessanterweise war bei einigen Markern eine hohe Variation der Expression einzelner Marker der Monozyten in den CMML-Proben zu erkennen (Abb. 10). Dies dürfte Ausdruck der monozytären Dysplasie im Rahmen der CMML sein.

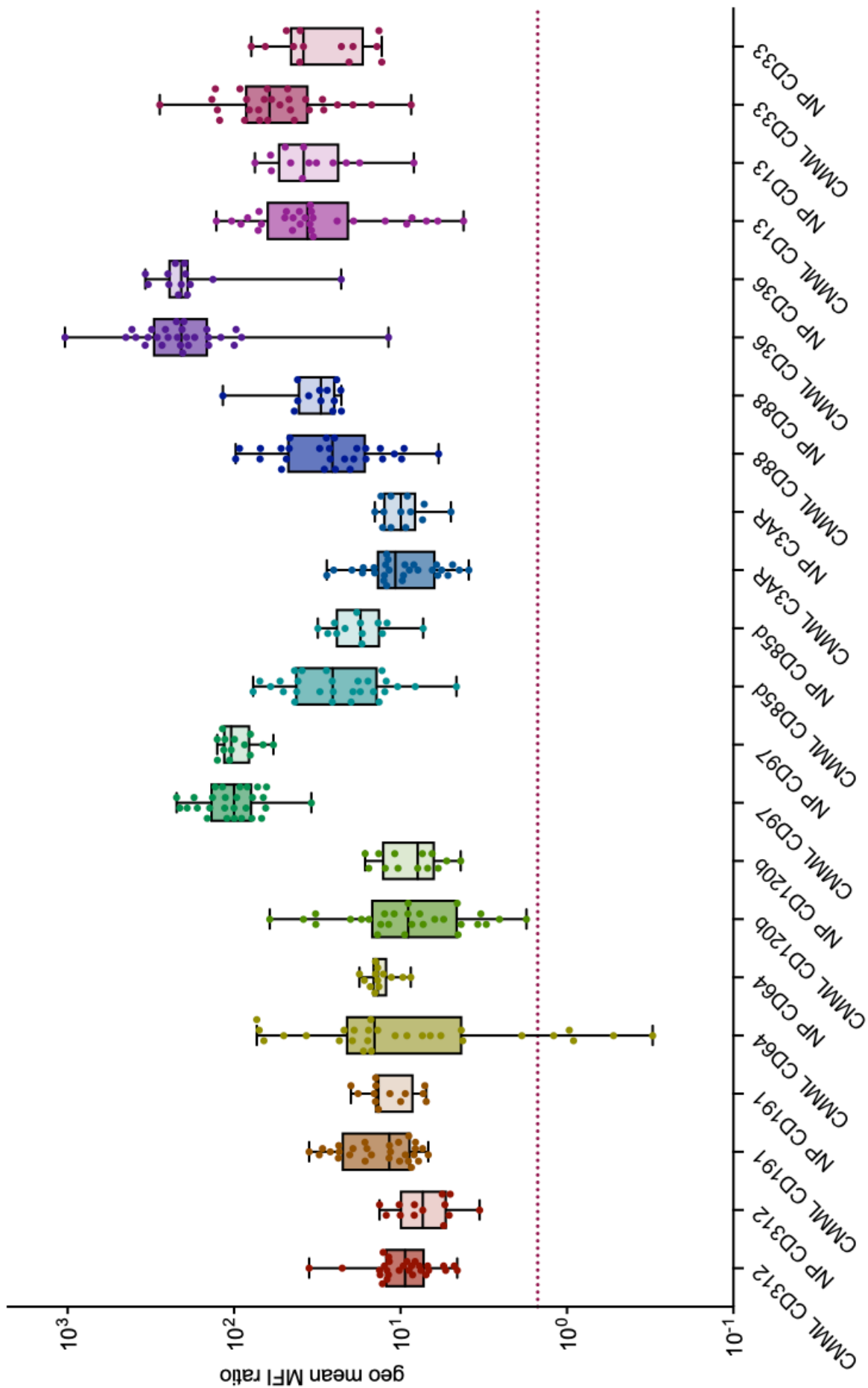


Abb. 10 | MFI Ratio des geometrischen Mittels der Marker CD312, CD64, CD120b, CD97, CD85d, CD88, C3AR, CD36, CD33, CD13, CD191 bei Monozyten von GMML Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe

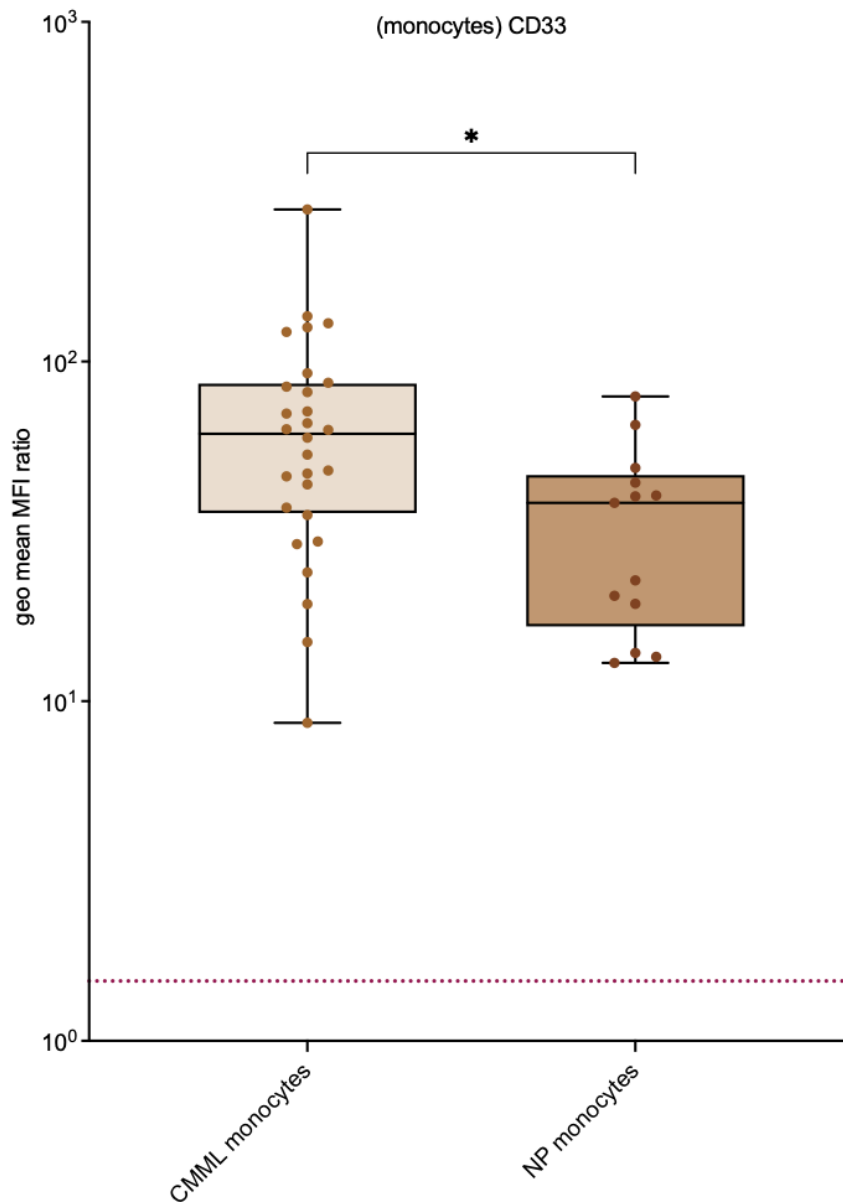


Abb. 11 | Signifikanter Unterschied der Expression des Markers CD33 in Monozyten von CMML- und Normalproben ( $p=0,0108$ ).

In Abb. 12 ist nun die Markerexpressionen der CD34<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zwischen CMML-Proben und der Kontrollgruppe dargestellt. Der mediane Anteil der CD34<sup>+</sup> Blasten in den 23 CMML-Proben betrug 4,2% (0,1% bis 28,2%), in den acht Normalproben (KM) 1,66% (0,7 bis 4,05%).

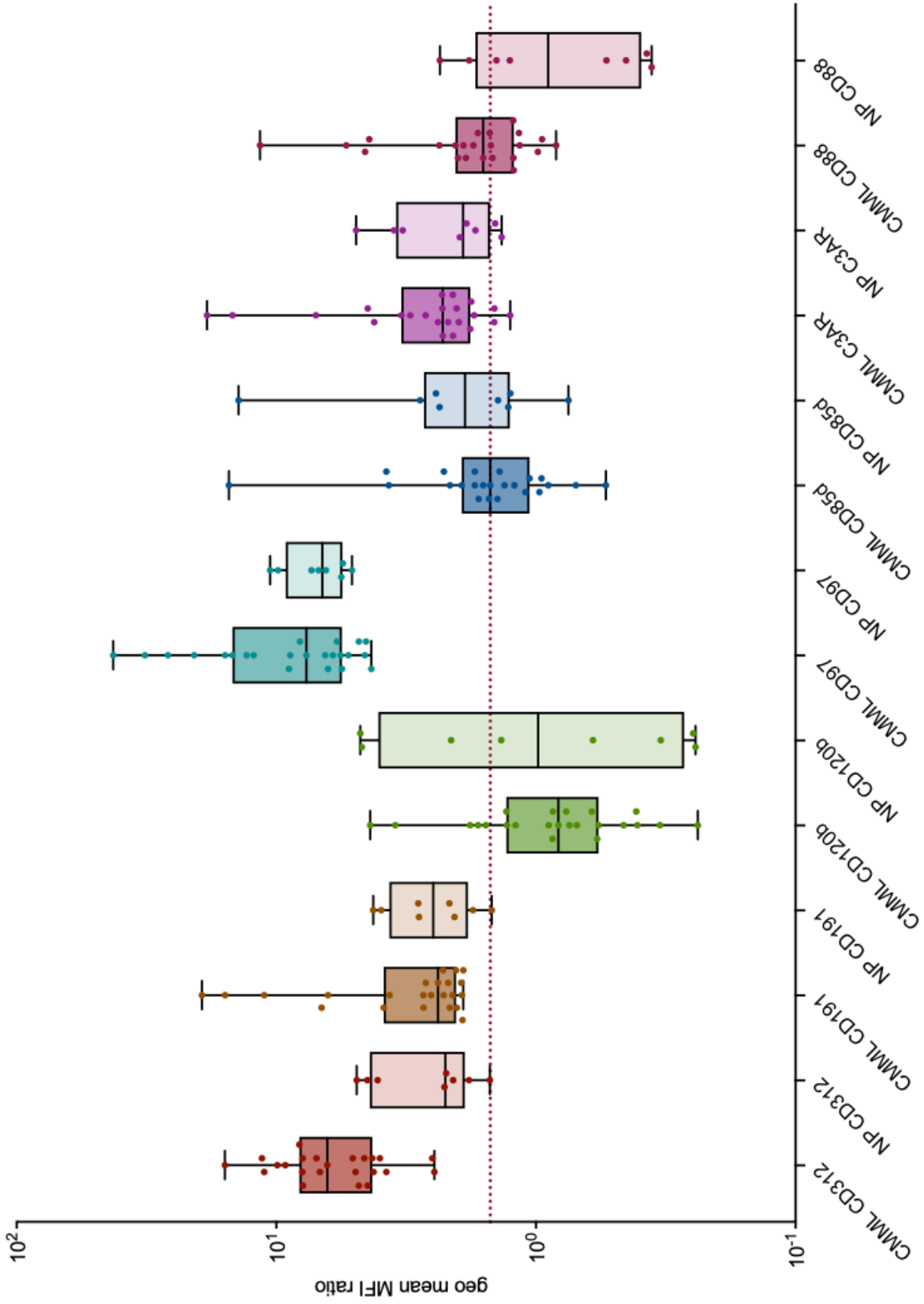


Abb. 12 | MFI Ratio des geometrischen Mittels der Marker CD312, CD191, CD120b, CD97, CD85d, CD88 und C3AR bei CD34<sup>+</sup> Blasten von CMML Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe

Eine signifikant erhöhte Expression wurde für den Marker CD312 in CD34-positiven Zellen in CMML-Proben im Vergleich zu Normalproben gefunden (siehe auch Abb. 13). Die MFI-Ratio für CD312 in CD34-positiven CMML-Zellen betrug 7,08 (2,47 bis 15,81) im Vergleich zu 2,92 (1,50 bis 4,91) in CD34-positiven gesunden hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ( $p=0,0003$ ).

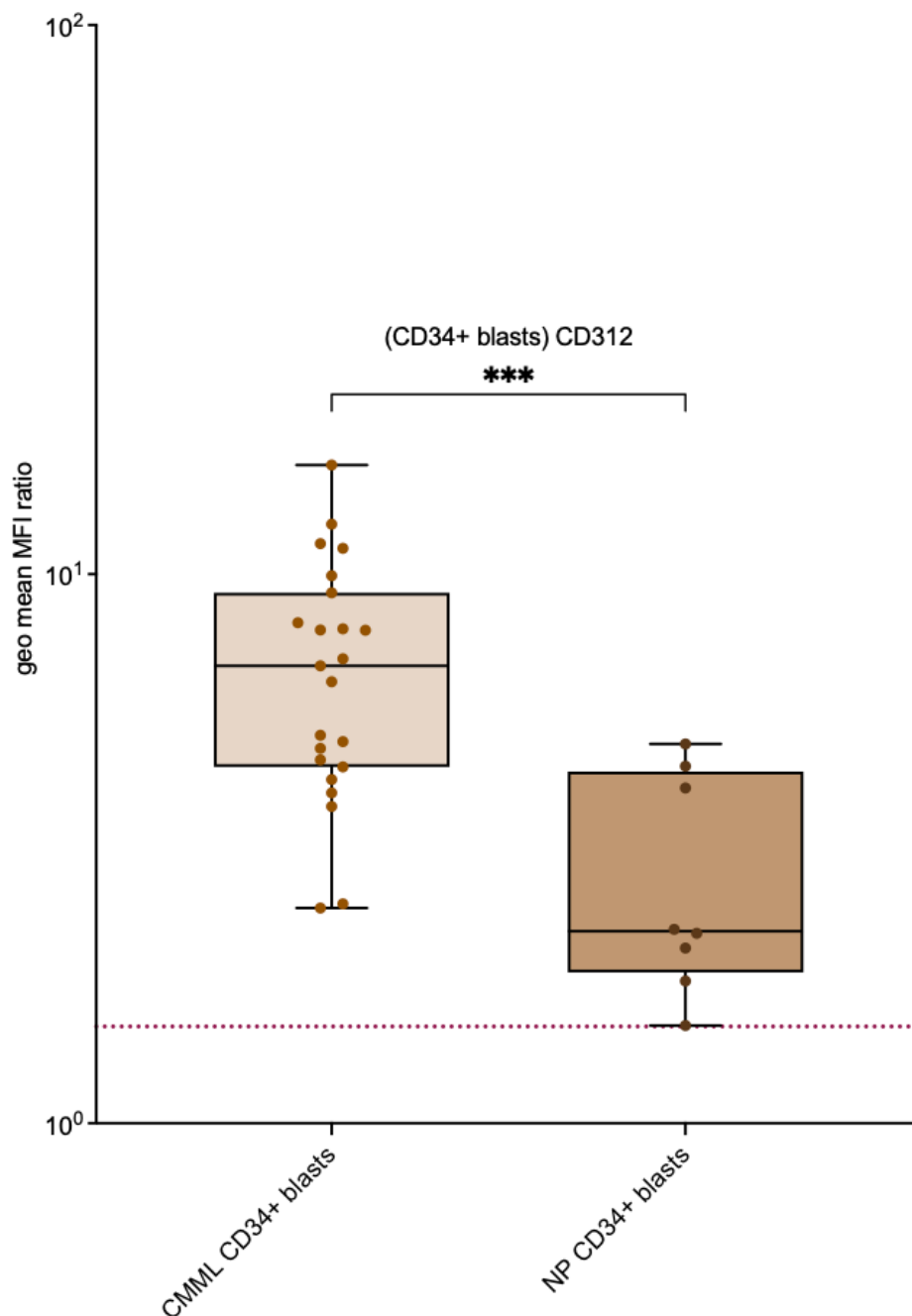
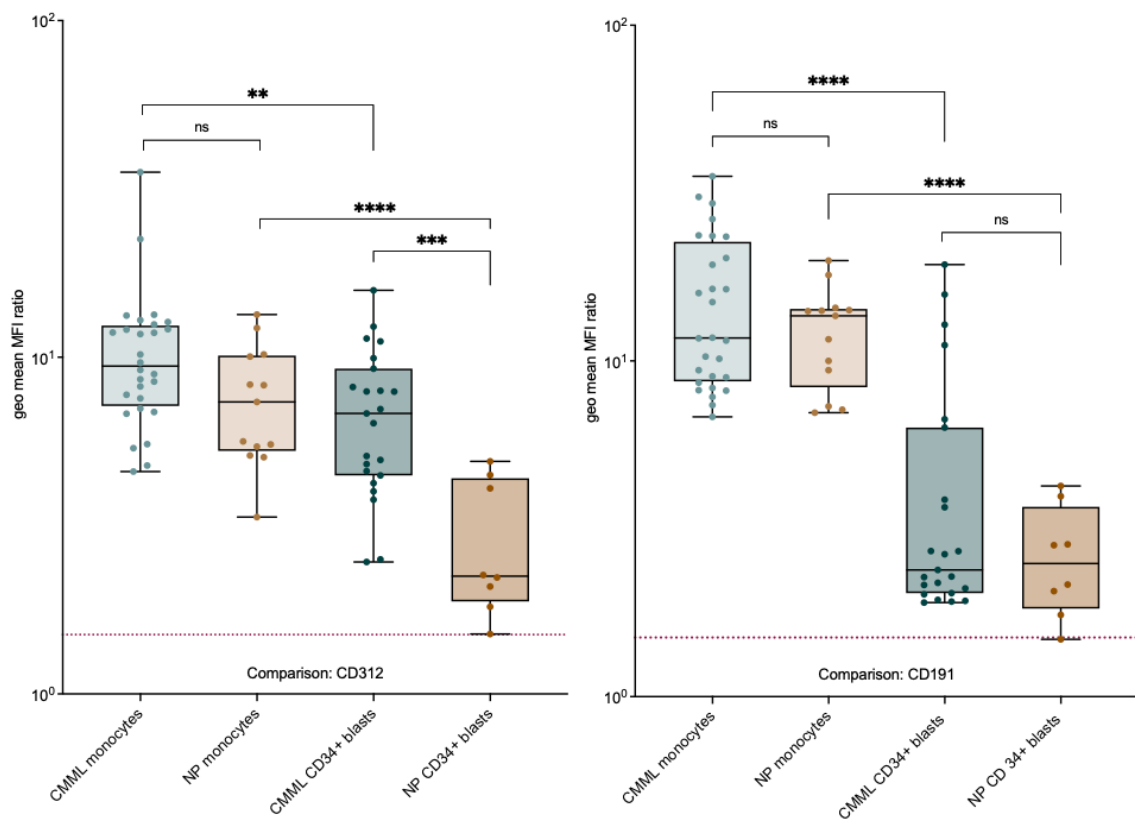
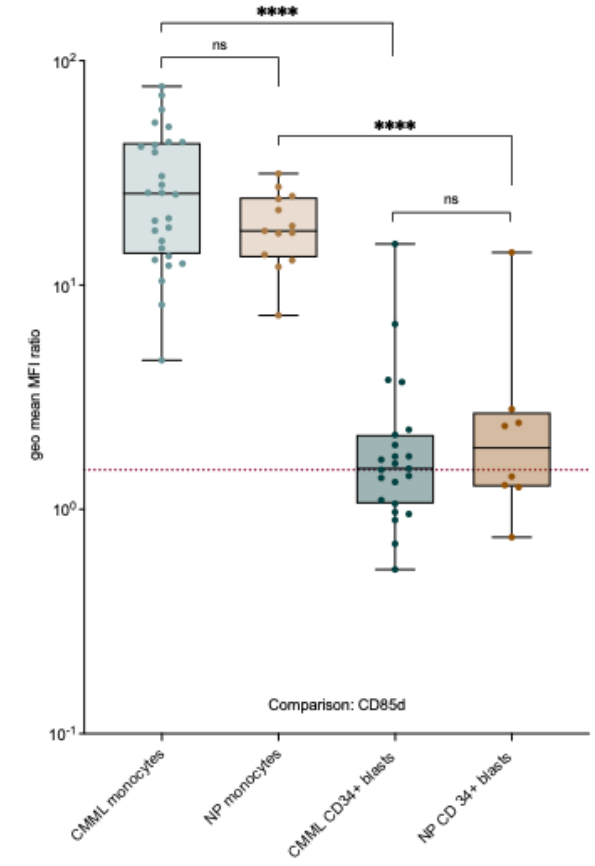
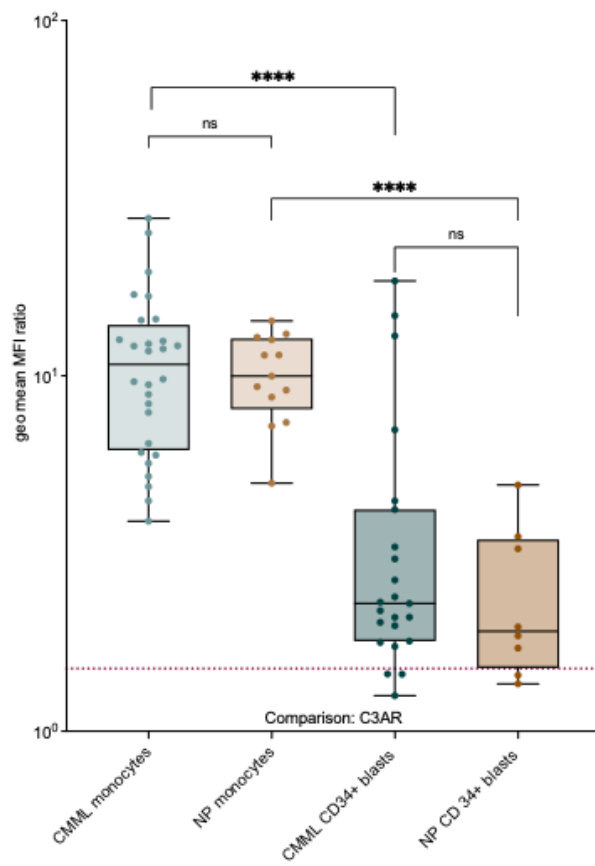
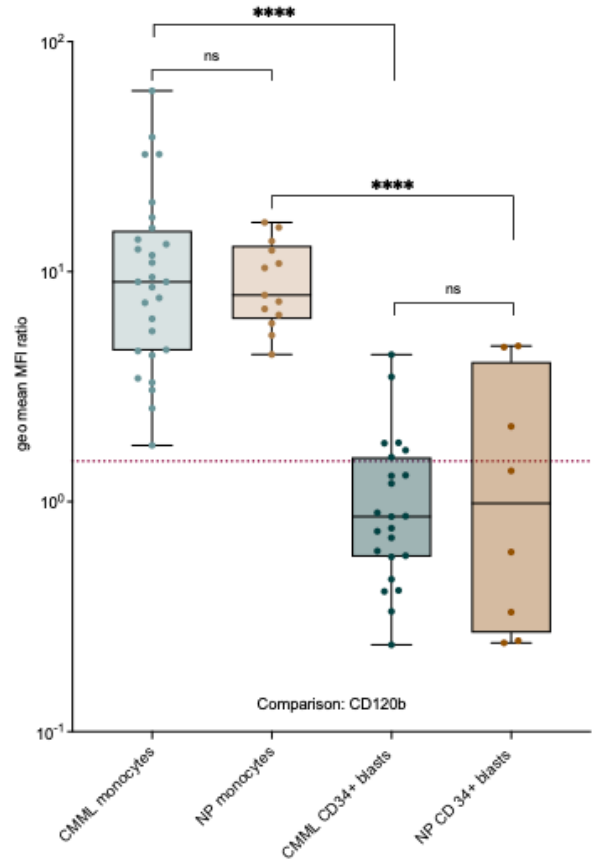
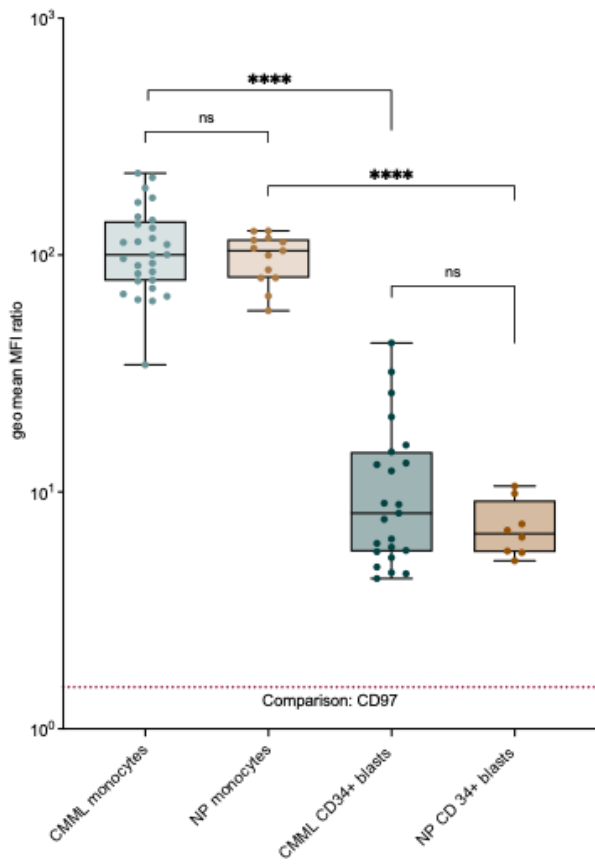


Abb. 13 | Hochsignifikanter Unterschied der Expression des Markers CD312 in CD34<sup>+</sup>-Zellen von CMML- und Normalproben ( $p= 0,0003$ ).

Des weiteren führten wir eine Analyse der Expression der Marker CD312, CD191, CD97, CD120b, CD85d, C3AR und CD88 zwischen Monozyten und CD34<sup>+</sup> Zellen sowohl in Normal- als auch CMML-Proben durch. Hier zeigte sich eine höhere Expression der Marker CD191, CD97, CD120b, CD85d, C3AR und CD88 in Monozyten im Vergleich zu CD34<sup>+</sup> Zellen sowohl in Normal- als auch CMML-Proben (siehe Abb. 14). Die Expression von CD312 war nur in den Normalproben signifikant höher in den Monozyten als in den CD34<sup>+</sup> Zellen. In den CMML-Proben zeigte sich eine ähnlich hohe Expression sowohl in den Monozyten als auch den CD 34<sup>+</sup> Blasten und somit kein signifikanter Unterschied der CD312-Expression zwischen den beiden Zellpopulationen.





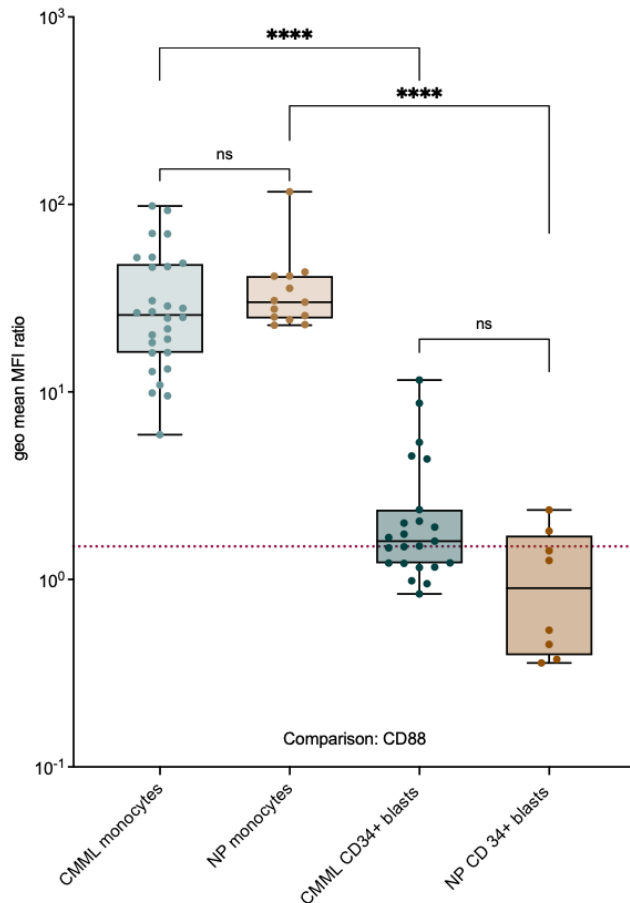


Abb. 14 | Gegenüberstellung der Expression einzelner Marker in Monozyten und CD34+ Zellen bei CMML-Patient\*innen im Vergleich zu den Kontrollproben. (Abkürzungen: ns = non signifikant, \*\*p=0,0027, \*\*\*p=0,0003, \*\*\*\* p<0.0001)

## 4.5 ANALYSE DER GENETISCHEN DATEN

Da die CMML hinsichtlich ihrer somatischen Veränderungen heterogen ist, haben wir in einem weiteren Schritt analysiert, ob es einen möglichen Zusammenhang des aberrant hoch-exprimierten Oberflächenmarker CD312 und entsprechenden genetischen Mutationen gibt. Für diese Analyse wurden die CMML-Proben bezüglich folgender Mutationen charakterisiert und unterteilt:

- × Mutationen, die den RAS-Signalweg aktivieren
- × *SRSF2*-Mutation

- × *TET2*-Mutation
- × *TET2* und *SRSF2* Mutationen.

Von den initial 28 CMML-Proben mussten 5 ausgeschlossen werden, da sie zu wenige CD34<sup>+</sup> Zellen enthielten. Von den verbleibenden 23 Proben lagen bei vier Proben keine ausreichenden Daten bezüglich der Mutationen vor. Somit standen uns für diese Analyse insgesamt 19 Proben zur Verfügung. Von diesen wiesen 16 eine RAS-Mutation, 5 eine Mutation im *SRSF2*-Gen und 9 eine Mutation im *TET2*-Gen und 4 eine Mutation im *SRSF2* als auch *TET2* auf. Der Vergleich der CD312-Expression in CD34<sup>+</sup> Zellen zwischen den Gruppen erfolgte so, dass die Gruppe der Proben mit den entsprechenden genetischen Veränderungen mit der Gruppe an Proben verglichen wurde, die diese Veränderung(en) nicht hatte(n); z.B. 6 Proben mit einer Mutation, die den RAS-Signalweg aktiviert, versus 3 Proben, die keine RAS-aktivierende Mutation zeigten bzw. die 5 Proben mit einer *SRSF2*-Mutation versus den restlichen 14 Proben, die keine *SRSF2*-Mutation hatten. Es konnte jedoch keine Assoziation zwischen der Expression von CD312 in CD34<sup>+</sup>-Zellen und einer bestimmten genetischen Veränderung in den CMML-Proben gefunden werden (siehe Abb. 15).

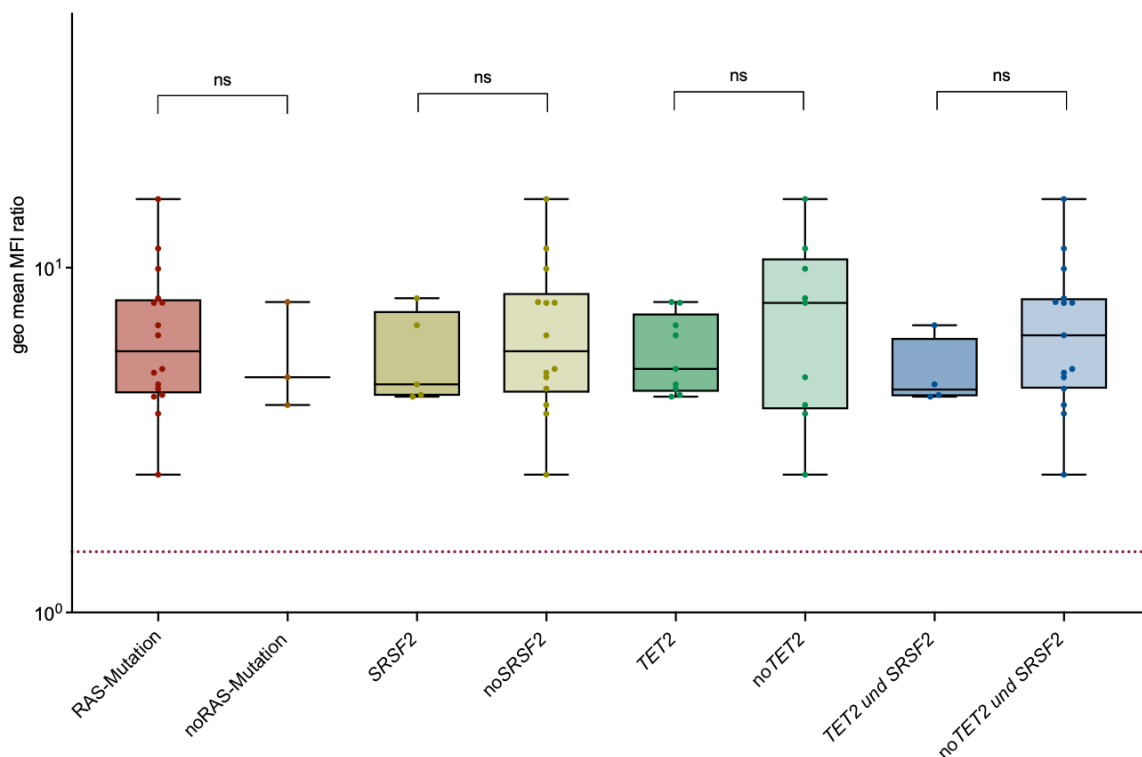


Abb. 15 | MFI Ratio des geometrischen Mittels von CD34<sup>+</sup> Blasten (CD312) von den 19 inkludierten CMML-Proben mit Mutationen die den RAS-Signalweg aktivieren, *SRSF2*-Mutation, *TET2*-Mutation sowie *TET2* und *SRSF2* Mutationen im Vergleich zu Patienten ohne Mutation.

## 5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden neue Oberflächenmarker auf neoplastischen Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen von Patient\*innen mit CMML im Vergleich zu gesunden Zellen verglichen. Durchflusszytometrische Methoden, die eine qualitative und semiquantitative Expressionsanalyse von Oberflächenantigenen auf Einzelzellbasis ermöglichen, wurden zu diesem Zweck eingesetzt. Ziel war das Aufzeigen neuer diagnostischer Möglichkeiten bei der CMML und die Identifizierung potenzieller Oberflächenantigene, die für eine zielgerichtete Therapie, unter anderem mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern oder einer CAR T-Zelltherapie, geeignet sein könnten. Da die Immunphänotypisierung und genetische Analysen gängige Methoden in der CMML-Diagnostik sind, könnten die aus diesen Analysen gewonnenen Informationen zur genaueren Charakterisierung von CMML-Proben als auch bei der Optimierung der Behandlungsoptionen helfen.

### 5.1 VERHÄLTNIS M1- UND M2-MONOZYTEN ZUR DIAGNOSTIK EINER CMML

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression von Zelloberflächenmarkern bei M1- und M2-Monozyten bei Patient\*innen mit CMML und gesunden Kontrollpersonen untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung des Anteils an klassischen M1-Monozyten (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>) bei CMML-Patient\*innen, was im Einklang mit bekannten Studien steht, die M1-Monozyten als diagnostischen Marker für CMML hervorheben bzw. etabliert haben ([14 + weitere Zitate]). Unsere Analyse zeigte, dass bei 26 von 28 CMML-Proben der Anteil der M1-Monozyten über dem Cut-off-Wert von 94% lag, in Summe also bei 93% aller unserer CMML-Proben. Dieses Ergebnis deckt sich

sehr gut mit den Daten aus der Literatur. So fanden Eric Solary und seine Gruppe in der initialen Beschreibung dieses Phänomens bei ca. 92% ihrer CMML Patient\*innen mehr als 94% M1-Monozyten [12], [14], [33], [34], [35]. Damit bestätigten unsere Daten, dass eine Erhöhung der M1-Monozytenpopulation >94% in den meisten Fällen spezifisch für das Vorliegen einer CMML ist und entsprechend als diagnostischer Indikator verwendet werden kann. Hingegen waren in unseren Kontrollproben die M1-Monozyten immer unter 94%, was die Relevanz dieses diagnostischen Tests weiter untermauert. [12], [36]

## 5.2 MARKER-EXPRESSIONSANALYSE IN NORMALEN M1- UND M2-MONOZYTEN

Aufgrund der Tatsache, dass bei CMML-Proben kaum Monozyten vom M2-Phänotyp zu detektieren sind, haben wir die Expression der ausgewählten Marker in den Monozyten-Subpopulationen nur in gesunden Normalproben analysiert. Hier zeigten die Ergebnisse, dass bestimmte Oberflächenmarker, insbesondere CD312 ( $p < 0,0001$ ), CD85d ( $p < 0,0001$ ), C3AR ( $p < 0,0001$ ), sowie CD88 ( $p < 0,0001$ ) eine signifikant höhere Expression auf M2-Monozyten aufweisen. Diese Marker könnten daher zur Identifizierung von M2-Monozyten dienen. CD64 ( $p < 0,0001$ ), CD36 ( $p < 0,0001$ ), CD97 ( $p = 0,0295$ ) und CD33 ( $p = 0,0102$ ) waren in M2-Monozyten im Vergleich zu M1-Monozyten signifikant geringer exprimiert. Die Unterschiede in der Expression dieser Marker könnten zur besseren Identifizierung der M1- und M2-Subpopulationen dienen, wie dies auch für die Marker CD36 und CD192 bereits beschrieben wurde [37]. Die hier beschriebenen, unterschiedlich exprimierten Marker, wie CD312, C3AR, CD88 und CD64 könnten aber auch für zukünftige Untersuchungen herangezogen werden, um weitere Subpopulationen innerhalb der M1- oder M2-Monozyten zu identifizieren oder unterschiedliche Aktivierungszustände der einzelnen Subpopulationen zu erkennen.

### 5.3 MARKEREXPRESSION BEI MONOZYTEN UND CD34<sup>+</sup> BLASTEN BEI CMML-PATIENT\*INNEN

In der Analyse der Monozyten fanden sich mit Ausnahme von CD33 keine Marker die in CMML-Patient\*innen signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe exprimiert wurden. Interessanterweise zeigte die einzelnen Marker auf Monozyten der CMML-Patient\*innen jedoch eine deutliche höhere Variation der Expression in den unterschiedlichen Proben als bei den Kontrollpersonen. Diese hohe Variation könnte Ausdruck einer monozytären Dysplasie sein [38]. Die erhöhte Expression von CD33 in CMML-Proben gibt einen Hinweis, dass unter Umständen gegen CD33-gerichtete Immuntherapeutika, wie zum Beispiel das bei der AML zugelassene Medikament Gemtuzumab-Ozagamicin (GO), auch bei der CMML vielversprechende Ergebnisse liefern könnte. In der Tat konnte für GO bereits gezeigt werden, dass es in vitro die Proliferation von CMML-Zellen hemmt und das Engraftment einer humanen CMML in immunsupprimierten Mäusen verzögert [39]. Zukünftige klinischen Studien mit GO bei Patient\*innen könnten also von großem Interesse sein.

Unter allen analysierten Markern, zeigte nur CD312 eine höhere Expression auf CD34<sup>+</sup> Blasten in CMML-Patient\*innen im Vergleich zu gesunden, normalen CD34-positiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. CD312 ist auch bekannt als Adhesion-G-Protein-Coupled Receptor E2 (ADGRE2), ein Oberflächenprotein, das eine wichtige Rolle in der Immunfunktion und Zelladhäsion spielt. Es gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist hauptsächlich auf myeloischen Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert [40]. CD312 ist an Zelladhäsion und Signaltransduktion beteiligt und spielt eine Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen. Bei der AML kann die abnormale Expression von CD312 zur pathologischen Aktivierung und Proliferation von leukämischen Zellen beitragen, was die Krankheit vorantreibt [41]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde CD312 zusammen mit CLL1 auch als vielversprechendes Zielantigen bei der AML identifiziert [19]. Bezüglich CMML sind jedoch bislang keine Daten zu CD312 publiziert worden. Daher liefern unsere Daten erste

Hinweise, dass CD312 ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, wie zum Beispiel einer CAR-T-Zell-Therapie, bei der CMML sein könnte. Die weitere Erforschung und Implementierung von CD312 als Zielmolekül in einer CMML-spezifischen CAR-T-Zelltherapie im Rahmen klinischer Studien könnte somit neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen und die Präzision, sowie die Effektivität der CMML-Therapie weiter verbessern [19], [20].

Zusätzlich zu den Expressionsdaten wurden im Rahmen dieser Arbeit auch das Profil der genetischen Mutationen bei CMML-Patient\*innen analysiert. Dabei fanden sich in Übereinstimmung zur Literatur meist Mutationen in Genen, die an der epigenetischen Regulation, der Signaltransduktion und der Spliceosom-Maschinerie beteiligt sind. Die häufigsten Mutationen wurden in den Genen *TET2* (~60%), *SRSF2* (~50%), *ASXL1* (~40%) und in den onkogenen RAS-Signalwegen (~30%) identifiziert. Diese Mutationen tragen zur Dysregulation der hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen bei und fördern die klonale Expansion sowie die Transformation zu malignen Zellen. [8] In der Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen den analysierten Oberflächenmarkern und den vorhandenen Mutationen festgestellt werden, was darauf hinweist, dass die ausgewählten Oberflächenmarker möglicherweise nicht ausreichend spezifisch sind, um die komplexen genetischen Veränderungen bei CMML präzise zu reflektieren.

Insgesamt stellt die relativ kleine Fallzahl an CMML-Patient\*innen, die in diese Studie eingeschlossen werden konnte, eine wesentliche Limitation dieser Studie dar. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Proben und der Einbeziehung zusätzlicher Oberflächenmarker wären erforderlich, um nicht nur potenziellen Zusammenhänge zwischen der Expression bestimmter Marker und bestimmter Mutationen besser zu verstehen, sondern auch weitere diagnostische oder prognostische Marker im Zusammenhang mit der Genetik und der Therapie der CMML zu identifizieren. Zusätzlich würde die Analyse der CD312-Expression in einer größeren CMML-Kohorte die Aussagekraft bezüglich therapeutischen Potenzials dieses Oberflächenantigens als Zielstruktur im Rahmen einer immunologischen Therapie verbessern.

## 6 FAZIT UND AUSBLICK

Ziel dieser Masterarbeit war es, neue Oberflächenmarker auf ihr diagnostisches und therapeutisches Potenzial bei CMML zu untersuchen. Unter den elf mittels Durchflusszytometrie getesteten Markern konnte CD312 (ADGRE2) als vielversprechender Marker identifiziert werden. Seine erhöhte Expression in CD34-positiven neoplastischen Zellen in CMML-Patient\*innen im Vergleich zu gesunden Stamm- und Vorläuferzellen macht es zu einem wichtigen Ziel für die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze, einschließlich der CAR-T-Zelltherapie. Weiterführende Untersuchungen der CD312-Expression in anderen Zellen als auch die Etablierung klinischer Studien, die CD312 als Target im Rahmen immuntherapeutischer Ansätze nützt, könnten zur Entwicklung präziserer und effektiverer Behandlungen bei der CMML als auch bei anderen myeloische Neoplasien beitragen.

## 7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- [1] „Cancer - Key facts“, WHO. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] E. Ashkan und J. Law York, „Leukämie im Überblick - Hämatologie und Onkologie“, Merck & Co. Zugegriffen: 26. März 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.msdmanuals.com/de/profi/h%C3%A4matologie-und-onkologie/leuk%C3%A4mien/leuk%C3%A4mie-im-%C3%BCberblick>
- [3] „Cancer facts and figures“, *American Cancer Society*, Nr. 500824, 2024.
- [4] O. Chan, A. Renneville, und E. Padron, „Chronic myelomonocytic leukemia diagnosis and management“, 1. Juni 2021, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41375-021-01207-3.
- [5] U. Germing, S. Blum, M. Lübbert, G. Metzgeroth, U. Platzbecker, und M. Pfeilstöcker, „Leitfaden - Chronische Myelomonozytäre Leukämie (CMML)“, März 2023, [Online]. Verfügbar unter: [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com)
- [6] J. Hadjadj, M. Michel, M. P. Chauveheid, B. Godeau, T. Papo, und K. Sacre, „Immune thrombocytopenia in chronic myelomonocytic leukemia“, *Eur J Haematol*, Bd. 93, Nr. 6, S. 521–526, Dez. 2014, doi: 10.1111/EJH.12393.
- [7] J. D. Khoury *u. a.*, „The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms“, 1. Juli 2022, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1.
- [8] M. M. Patnaik und A. Tefferi, „Chronic myelomonocytic leukemia: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management“, *Am J*

*Hematol*, Bd. 97, Nr. 3, S. 352–372, März 2022, doi: 10.1002/ajh.26455.

- [9] „Table 6 Diagnostic criteria of chronic myelomonocytic leukaemia.“ Zugegriffen: 3. April 2024. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1/tables/6>
- [10] O. Wagner-Ballon *u. a.*, „ELN iMDS flow working group validation of the monocyte assay for chronic myelomonocytic leukemia diagnosis by flow cytometry“, *Cytometry B Clin Cytom*, Bd. 104, Nr. 1, S. 66–76, Jän. 2023, doi: 10.1002/cyto.b.22054.
- [11] E. Such *u. a.*, „Development and validation of a prognostic scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia Key Points“, 2017, doi: 10.1182/blood-2012-08.
- [12] E. Solary, O. Wagner-Ballon, und D. Selimoglu-Buet, „Incorporating flow cytometry and next-generation sequencing in the diagnosis of CMML. Are we ready for prime?“, 1. Juni 2020, *Bailliere Tindall Ltd.* doi: 10.1016/j.beha.2019.101134.
- [13] M. Guilliams, A. Mildner, und S. Yona, „Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes“, 16. Oktober 2018, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005.
- [14] D. Selimoglu-Buet *u. a.*, „Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia“, *Blood*, Bd. 125, Nr. 23, S. 3618–3626, Juni 2015, doi: 10.1182/blood-2015-01-620781.
- [15] M. M. Patnaik und A. Tefferi, „Chronic Myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management“, *Am J Hematol*, Bd. 95, Nr. 1, S. 97–115, Jän. 2020, doi: 10.1002/ajh.25684.
- [16] J. S. Welch *u. a.*, „The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia“, *Cell*, Bd. 150, Nr. 2, S. 264–278, Juli 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.023.

- [17] R. M. Carr *u. a.*, „RAS mutations drive proliferative chronic myelomonocytic leukemia via a KMT2A-PLK1 axis“, *Nat Commun*, Bd. 12, Nr. 1, S. 2901, Mai 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23186-w.
- [18] C. Ricci, E. Fermo, S. Corti, und M. Molteni, „RAS Mutations Contribute to Evolution of Chronic Myelomonocytic Leukemia to the Proliferative Variant“, *Clinical Cancer Research*, Bd. 16, 2010.
- [19] S. Haubner *u. a.*, „Cooperative CAR targeting to selectively eliminate AML and minimize escape“, *Cancer Cell*, Bd. 41, Nr. 11, S. 1871-1891.e6, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.ccell.2023.09.010.
- [20] C. H. June, R. S. O’Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, und M. C. Milone, „CAR T cell immunotherapy for human cancer“, *Science* (1979), Bd. 359, Nr. 6382, S. 1361–1365, März 2018, doi: 10.1126/science.aar6711.
- [21] J. Schanz und N. Brökers, „Durchflusszytometrie in der Hämatologie“, in *Durchflusszytometrie in der Hämatologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2023, S. 1–10. doi: 10.1007/978-3-662-67402-4\_1.
- [22] J. V. Ravetch und S. Bolland, „IgG Fc Receptors“, *Annu Rev Immunol*, Bd. 19, Nr. 1, S. 275–290, Apr. 2001, doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275.
- [23] S. Yang *u. a.*, „Differential roles of TNF $\alpha$ -TNFR1 and TNF $\alpha$ -TNFR2 in the differentiation and function of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases“, *Cell Death Dis*, Bd. 10, Nr. 1, S. 27, Jän. 2019, doi: 10.1038/s41419-018-1266-6.
- [24] J. Hamann, B. Vogel, G. M. van Schijndel, und R. A. van Lier, „The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF).“, *J Exp Med*, Bd. 184, Nr. 3, S. 1185–1189, Sep. 1996, doi: 10.1084/jem.184.3.1185.

- [25] X. Kang *u. a.*, „Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors“, *Cell Cycle*, Bd. 15, Nr. 1, S. 25–40, Jän. 2016, doi: 10.1080/15384101.2015.1121324.
- [26] J. C. Varela und S. Tomlinson, „Complement“, *Hematol Oncol Clin North Am*, Bd. 29, Nr. 3, S. 409–427, Juni 2015, doi: 10.1016/j.hoc.2015.02.001.
- [27] M. Febbraio, D. P. Hajjar, und R. L. Silverstein, „CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism“, *Journal of Clinical Investigation*, Bd. 108, Nr. 6, S. 785–791, Sep. 2001, doi: 10.1172/JCI14006.
- [28] B. Van Ness, „New technologies in the myeloma gene mine“, *Blood*, Bd. 100, Nr. 4, S. 1109–1109, Aug. 2002, doi: 10.1182/blood-2002-06-1834.
- [29] U. Lendeckel, F. Karimi, R. Al Abdulla, und C. Wolke, „The Role of the Ectopeptidase APN/CD13 in Cancer“, *Biomedicines*, Bd. 11, Nr. 3, S. 724, Feb. 2023, doi: 10.3390/biomedicines11030724.
- [30] G. Qiang und J. Fan, „CCR1 (chemokine (C-C motif) receptor 1)“, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2010.
- [31] T. Hu, N. Chitnis, D. Monos, und A. Dinh, „Next-generation sequencing technologies: An overview“, *Hum Immunol*, Bd. 82, Nr. 11, S. 801–811, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.
- [32] K. Neveling und A. Hoischen, „Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung“, *Medizinische Genetik*, Bd. 26, Nr. 2, S. 231–238, Juni 2014, doi: 10.1007/s11825-014-0447-7.
- [33] T. Picot *u. a.*, „Evaluation by Flow Cytometry of Mature Monocyte Subpopulations for the Diagnosis and Follow-Up of Chronic Myelomonocytic Leukemia.“, *Front Oncol*, Bd. 8, S. 109, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00109.

- [34] S. M. Hwang, H. Ahn, S. Jeon, J. Park, Y. Chang, und H. Kim, „Monocyte subsets to differentiate chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis.“, *J Clin Lab Anal*, Bd. 35, Nr. 1, S. e23576, Jän. 2021, doi: 10.1002/jcla.23576.
- [35] C. A. Hudson, W. R. Burack, und J. M. Bennett, „Emerging utility of flow cytometry in the diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia.“, *Leuk Res*, Bd. 73, S. 12–15, Okt. 2018, doi: 10.1016/j.leukres.2018.08.015.
- [36] M. B. Geyer, M. Hsu, S. M. Devlin, M. S. Tallman, D. Douer, und J. H. Park, „Monocyte subset analysis accurately distinguishes CMML from MDS and is associated with a favorable MDS prognosis“, 30. März 2017, *American Society of Hematology*. doi: 10.1182/blood-2016-11-749507.
- [37] G. D. Thomas *u. a.*, „Human Blood Monocyte Subsets“, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Bd. 37, Nr. 8, S. 1548–1558, Aug. 2017, doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309145.
- [38] A. Porwit *u. a.*, „Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues“, *Cytometry B Clin Cytom*, Bd. 104, Nr. 1, S. 27–50, Jän. 2023, doi: 10.1002/cyto.b.22108.
- [39] G. Eisenwort *u. a.*, „Phenotypic characterization of leukemia-initiating stem cells in chronic myelomonocytic leukemia“, *Leukemia*, Bd. 35, Nr. 11, S. 3176–3187, Nov. 2021, doi: 10.1038/s41375-021-01227-z.
- [40] K.-Y. I, W.-Y. Tseng, W.-C. Wang, S. Gordon, K.-F. Ng, und H.-H. Lin, „Stimulation of Vibratory Urticaria-Associated Adhesion-GPCR, EMR2/ADGRE2, Triggers the NLRP3 Inflammasome Activation Signal in Human Monocytes“, *Front Immunol*, Bd. 11, Jän. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2020.602016.
- [41] D. Huang *u. a.*, „Adhesion GPCR ADGRE2 Maintains Proteostasis to Promote Progression in Acute Myeloid Leukemia“, *Cancer Res*, Bd.

84, Nr. 13, S. 2090–2108, Juli 2024, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-2314.