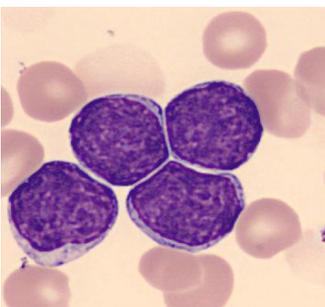


Labordiagnostik der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)

Die chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (CLL) gilt als die häufigste Leukämie der westlichen Länder. Allein in Deutschland liegt die Zahl jährlicher Neuerkrankungen bei ca. 10-15/100.000 Personen. Es handelt sich um ein niedrig malignes Non-Hodgkin-Lymphom, das in der Regel leukämisch verläuft. Die moderne Labordiagnostik der CLL umfasst neben der primärdiagnostisch obligaten Zytomorphologie und Immunphänotypisierung zunehmend auch zyto-genetische und molekularbiologische Marker mit prognostischer Relevanz.

Zytomorphologie:

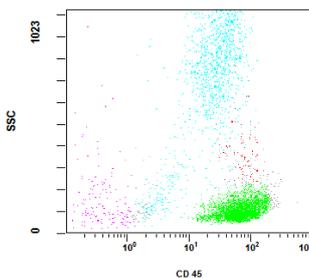


Morphologisch zeigt sich eine Vermehrung kleiner, reifer Lymphozyten mit dichtem, z. T. scholligem Chromatin und schmalem Zytoplasmasaum. Nukleoli sind nicht erkennbar. Neben diesen kleinen Lymphozyten kann eine Subpopulation größerer, atypischer Lymphozyten bzw. Prolymphozyten auftreten, deren Anteil jedoch 55 % nicht übersteigen sollte im Hinblick auf eine B-Prolymphozyten-Leukämie oder B-PLL.

Abb. 1: Zytomorphologie einer fortgeschrittenen CLL: Starke Vermehrung kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit scholligem Chromatin.

Immunphänotypisierung:

Für die Diagnose einer CLL sollten im peripheren Blut ≥ 5000 klonale B-Zellen/ul nachweisbar sein.¹ Die Abklärung einer B-Zellklonalität sowie des für die CLL charakteristischen Antigenexpressionsmusters erfolgt mittels Immunphänotypisierung. Hier findet sich neben einer Expression von B-Zellantigenen wie CD19, CD20 und CD23 die Koexpression des T-Zellantigens CD5. CD20 und die Oberflächenimmunglobuline werden im Vergleich zu reifen B-Zellen mit verminderter Antigendichte exprimiert.



Aus prognostischer Sicht sollte die Expression des Aktivierungsantigens CD38 sowie des intrazellulären Proteins ZAP-70 geprüft werden. Für diese Marker wurde eine Assoziation beschrieben im Hinblick auf den Mutationsstatus der Immunglobulin-Schwerkettengene bzw. IgVH-Gene. Demnach liegt bei Überexpression von ZAP-70 und CD38 in der Regel ein unmutierter, prognostisch ungünstiger IgVH-Status vor, bei geringer oder fehlender Expression hingegen ein hypermutierter IgVH-Status.² Da jedoch keine absolute Korrelation besteht, sollte in Zweifelsfällen (z. B. progredienter klinischer Verlauf bei unauffälligem CD38- und/oder ZAP-70-Befund) die IgVH-Analyse (s. u.) durchgeführt werden.

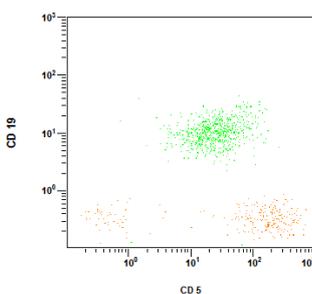


Abb. 2: Zytomorphologie einer fortgeschrittenen CLL: Starke Vermehrung kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit scholligem Chromatin.

Klassische Zytogenetik:

Die Analyse des kompletten Chromosomensatzes ermöglicht unter optimierten Zellkulturbedingungen, z. B. Zusatz von IL2 und DSP30 den Nachweis zusätzlicher, nicht durch die FISH-Analytik (s. u.) erfasste Aberrationen.³ Darüber hinaus findet sich bei ca. 20 % der CLL-Patienten ein komplex aberranter Karyotyp (3 oder mehr Aberrationen), der als prognostisch ungünstig einzustufen ist und häufig in Kombination mit einem unmutierten IgVH-Status und/oder der p53-Deletion auftritt.

Molekularzytogenetik (FISH):

Bei der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FiSH) an Interphase-Zellkernen werden bestimmte, für die CLL charakteristische Aberrationen durch eine Auswahl chromosomenspezifischer Gensonden abgeklärt. Mit dieser Methode sind bei ca. 80 % der CLL-Fälle genetische Veränderungen nachweisbar. Die Ergebnisse erlauben eine Einteilung in 5 prognostisch relevante Gruppen wie folgt:

Gruppe	Aberration	Häufigkeit	Monate(*)	Prognose
1	13q14	50-55%	133	gut
2	keine	15-20%	111	intermediär
3	Trisomie 12	15-20%	114	intermediär
4	Deletion 11q	15-20%	79	schlecht
5	Deletion 17p	5-10%	32	schlecht

Tab. 1: Prognosegruppen der CLL nach Molekularzytogenetik *Medianes Überleben in Monaten, modifiziert nach 4

Der Nachweis der Deletion 17p, die das Gen TP53 betrifft, ist nicht nur von prognostischer Bedeutung, sondern beeinflusst auch das weitere therapeutische Vorgehen. So zeigen Patienten mit einer 17p-Deletion oder TP53-Mutation ein schlechtes Ansprechen auf alkylierende Substanzen, Purinanaloga und Rituximab; eine signifikant höhere Ansprechrate ergibt sich jedoch für diese Gruppe durch den Einsatz des anti-CD52-Antikörpers (Campath).⁵

Molekulargenetik:

Über die Analyse der variablen Regionen der Immunglobulin-Schwerkettengene (IgVH) sind bei 50 – 60 % der CLL-Patienten somatische Hypermutationen (SHM) nachweisbar. IgVH-Sequenzen mit weniger als 98 % Übereinstimmung im Vergleich zur entsprechenden Keimbahnsequenz gelten als hypermutiert, solche mit mehr als 98 % Homologie als unmutiert. Der IgVH-Status ist, unabhängig vom Krankheitsstadium, prognostisch relevant.

Demnach wird für Patienten mit hypermutierter CLL ein milderer Krankheitsverlauf bei signifikant längerer Überlebensrate beschrieben im Vergleich zur unmutierten, häufig schneller progredienten CLL. Unabhängig vom IgVH-Status ist der Nachweis des Gensegmentes IgVH3-21 mit einer stark ungünstigen Prognose assoziiert.⁶

Proliferationsmarker:

Neben der Lymphozytenverdopplungszeit werden die Serummarker Thymidinkinase (TK) und β 2-Mikroglobulin (β 2-M) eingesetzt zur Abschätzung der proliferativen Aktivität der CLL. Eine Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten gilt als Indikation zur Therapie. Die β 2-M-Spiegel korrelieren mit den klinischen Staging-Systemen; erhöhte Werte sind assoziiert mit einer kürzeren Überlebenszeit.⁷ Die TK korreliert mit der proliferativen Aktivität der CLL-Zellen und hat eine prognostische Relevanz insbesondere im frühen Krankheitsstadium.⁸

Verlaufskontrolle und MRD-Monitoring:

Für die Verlaufskontrolle sowie für das MRD-Monitoring unter Therapie eignet sich die durchflusszytometrische Analyse als schnelle und sensitive Methode mit einer Nachweisempfindlichkeit von einer B-Zelle auf 10000 Leukozyten. Eine sichere Abgrenzung der klonalen CLL-Zellen ist mithilfe spezieller Antikörperkombinationen wie z. B. CD19/CD5/Kappa/Lambda oder CD19/CD20/CD5/CD79b unter Berücksichtigung des bei Erstdiagnose ermittelten Immunphänotyps möglich.⁹

Testverfahren	Immunphänotypisierung: Multiparameter-Durchfluss-Zytometrie (MFC) Zytogenetik: Chromosomenanalyse Molekularzytogenetik: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Molekulargenetik: PCR mit Fragmentlängenanalyse und anschließender Sequenzierung.
Material	3 ml EDTA-Blut/-KM-Aspirat: Immunphänotypisierung 3 ml EDTA-Blut/-KM-Aspirat: FiSH-Diagnostik 3 ml EDTA-Blut/-KM-Aspirat :Molekulargenetik 5 ml Heparinblut/-KM-Aspirat: Zytogenetik 2 ml Serum: β 2-Mikroglobulin, Thymidinkinase

Für weitere Informationen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Dr. med. J. Owczarski
 Telefon 0221 940 505-613
 j.owczarski@wisplinghoff.de

Dr. rer. nat. D. Hoffmann
 Telefon 0221 940 505-609
 d.hoffmann@wisplinghoff.de

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Labor Dr. Wisplinghoff

Literatur:

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of CLL: A report from the International Workshop on CLL. Blood 111: 5446-56(2008)
2. Rassenti LZ, Huynh L et al.: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy gene mutation status as a predictor of disease progression in CLL. N. Engl J Med 351: 893- 901 (2004).
3. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T: Comprehensive genetic characterization of CLL. Leukemia 21, 2442-51 (2007)
4. Döhner H, Stilgenbauer S et al.: Genomic aberrations and survival in CLL. N Engl. J Med 343 (26): 1910-16 (2000)
5. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D et al: Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory CLL. J Clin Oncol. 26 (31): 5094-5100 (2009)
6. Butler T, Gribben J.G.: Biologic and clinical significance of molecular profiling in CLL. Blood Rev. 24(3):135-41(2010)
7. Di Giovanni S, Valentini G et al: Beta-2microglobulin is a reliable tumor marker in CLL. Acta Haematol 81: 181-185 (1989)
8. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C et al: Elevated serum thymidinkinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering CLL. Blood 93: 1732-37 (1999)
9. Rawstron A, Kennedy B et al: Quantitation of minimal disease levels in CLL. Blood 98: 29-35 (2001)