



Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Diagnostische Empfehlung

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

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) handelt es sich um die häufigste leukämische Erkrankung bei älteren Patienten. In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei Männern bei 7,4/100.000 und bei Frauen bei 4,8/100.000. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 70 und 75 Jahren. Das klinische und biologische Bild der CLL ist sehr heterogen. Die Erkrankung entsteht aus reifen B-Zellen, und beruht im Wesentlichen auf der Inhibition der Apoptose und Dysregulation der Proliferation in diesen Zellen. Der CLL geht in vielen Fällen ein asymptomatisches und unbemerktes Vorstadium mit Vermehrung klonaler B-Zellen voraus, das als monoklonale B-Zelllymphozytose (MBL) bezeichnet wird.

Klassifikation

Laut WHO-Klassifikation 2017 zählt die chronische lymphatische Leukämie (CLL) als indolentes lymphozytisches Lymphom, das durch einen leukämischen Verlauf charakterisiert ist, zu den reifen B-Zell-Neoplasien (siehe Aufzählung unterhalb). Eine Abgrenzung zum Mantelzelllymphom, follikulären Lymphom bzw. anderen Lymphom-Entitäten muss mittels Immunphänotypisierung, Zytomorphologie, FISH und Histologie erfolgen.

Diagnostik

Zytomorphologie

Zytomorphologisch zeigt die B-CLL neben der Vermehrung reifer lymphatischer Zellen häufiger das Phänomen von „Gumprecht“-schen Kernschatten: Diese entsprechen CLL-Zellen, welche artifiziell auf dem Objektträger beim Ausstreichen zerplatzen. Sie kommen vor, beweisen aber nicht die Diagnose. Von der typischen B-CLL wird die B-Prolymphozytenleukämie (B-PLL) abgegrenzt, bei welcher $\geq 55\%$ der Lymphozyten ein unreiferes Aussehen mit einem größeren Kern und einem deutlich sichtbaren Nukleolus zeigen. Bei der seltenen Transformation einer B-CLL in ein Richter-Syndrom finden sich blastäre Zellen.

Immunphänotypisierung

Die CLL weist einen typischen Phänotyp auf

Charakteristisch für die CLL ist eine B-Zellexpression der Oberflächenmarker CD19, CD20 und cCD79a und gleichzeitig eines aberranten CD5-Antigens. Es besteht eine schwache Oberflächenexpression von CD22. Charakteristischerweise beobachtet man auch eine schwache Expression der Oberflächenimmunglobuline mit einer klonalen Leichtkettenrestriktion. In der Regel wird CD23 exprimiert, was beim Mantelzelllymphom selten der Fall ist. Darüber hinaus weist das Mantelzelllymphom eine stärkere Expression der Oberflächenimmunglobuline sowie eine Expression von CD22 und FMC7 auf. Allerdings ist die Diagnose einer CLL aus einem einzelnen Marker alleine nicht möglich. Vielmehr hat sich die Zusammenschau aller untersuchten Antigene und die Verwendung des daraus abgeleiteten Matutes-Score als sinnvoll erwiesen (siehe Aufzählung unterhalb).

Matutes-Score für die B-CLL

immunphänotyp. Charakteristika der B-CLL

- CD5+
- CD23+
- FMC7-
- sIgM(+)
- sCD22(+) oder CD79b(+)

Abgrenzung zur MBL, CLL/PL und PLL

Von der CLL wird die **monoklonale B-Zelllymphozytose (MBL)** abgegrenzt: Hier findet sich eine monoklonale B-Zell-Population $< 5 \times 10^9/L$ im peripheren Blut; der Immunphänotyp entspricht dem einer CLL. Die Patienten sind zumeist asymptomatisch und weisen keine Neoplasie-typischen Laborveränderungen auf. Transformationen in eine B-CLL beobachtet man jährlich bei 1-2% aller Fälle.

Bei einer **CLL/PL** (CLL mit 10% bis 54% Prolymphozyten im peripheren Blut) zeigt der Immunphänotyp oftmals eine stärkere Expression von CD20 und Oberflächenimmunglobulinen (s-Ig) als bei der typischen CLL. Außerdem besteht eine schwächere Expression von CD23 sowie eine Positivität für CD22 und CD79b.

Bei der **Prolymphozytenleukämie (B-PLL)** ($\geq 55\%$ Prolymphozyten im peripheren Blut) zeigt sich keine oder nur eine schwache Koexpression von CD5, die Oberflächenexpression von Immunglobulinen und von CD20 ist stärker; ferner werden CD22 und FMC7 exprimiert.

Nachweis der minimalen Resterkrankung (MRD)

Neben der Festlegung der Diagnose erlaubt die Immunphänotypisierung den Nachweis minimaler Resterkrankung (MRD) bei der CLL. Der Phänotyp der CLL-Zellen - CD19+CD20+CD79-CD5+ - unterscheidet diese deutlich von normalen B-Lymphozyten. Die MRD-Level bei der CLL sind den Ergebnissen mehrerer größerer Studien zufolge von prognostischer Relevanz.



Chromosomenanalyse

Chromosomenanalyse liefert mehr Aberrationen als FISH

Die klassische Chromosomenanalyse hatte für die CLL früher nur eine untergeordnete Rolle gespielt, da die notwendige Kultivierung der CLL-Zellen *in vitro* kaum gelang. Seit eine Kultivierung der CLL-Zellen jedoch zuverlässig möglich ist lassen sich damit mehr Aberrationen als mit der FISH-Analyse nachweisen.

Auch zur Abgrenzung zu anderen reifzelligen B-Zell-Neoplasien kann die Chromosomenanalyse bei der B-CLL hilfreich sein. Es zeigte sich, dass Patienten bei unauffälligem Befund in der FISH-Analyse aber einem aberranten Karyotyp in der Chromosomenanalyse ein verkürztes Intervall bis zum Therapie-Bedarf und ein kürzeres Überleben aufwiesen, als Patienten, die auch in der Chromosomenanalyse einen normalen Karyotyp zeigten. Patienten mit komplexem Karyotyp werden als eigene, prognostisch ungünstige Gruppe betrachtet.

Wichtige Erweiterung zur FISH

Die Ergebnisse der Chromosomenbänderungsanalysen zeigten, dass das Spektrum zytogenetischer Veränderungen bei CLL größer ist, als dies durch die FISH-Methodik ersichtlich war. Typisch für die CLL sind genomisch unbalancierte Ereignisse (Haferlach C et al. 2007). Ungefähr 20% der CLL-Patienten zeigen in der Chromosomenbänderungsanalyse einen komplex aberranten Karyotyp (≥ 3 Aberrationen) (Haferlach C et al. 2007; Haferlach C et al. 2010). Eher seltene Veränderungen stellen die Trisomie 3 bzw. 3q-Zugewinne, Zugewinne von 8q und 11q sowie Translokationen unter Involvierung der Immunglobulin-Loci (2p12 (Ig kappa), 14q32 (IgH), 22q11 (Ig lambda)) dar (Döhner et al. 1999, Stilgenbauer et al. 2002). Die Translokationen t(11;14)(q13;q32), t(14;18)(q32;q21) und t(14;19)(q32;q13) werden ebenfalls selten beobachtet.

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH)

Mit der FISH-Analyse und einem Standard-Panel an FISH-Sonden können bei ca. 80 % der CLL-Patienten genetische Veränderungen nachgewiesen werden. Zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen zählen die 13q-Deletion, gefolgt von der Trisomie 12 und 11q-Deletion (Döhner et al. 2000, Hallek et al. 2008). Weniger häufig werden die 6q-Deletion und die 17p-Deletion beobachtet.

Weiterhin ist die Untersuchung auf eine t(11;14)/*IGH-CCND1* zur Abgrenzung zwischen CLL und Mantelzelllymphom sinnvoll. Allerdings können auch einige wenige eindeutige CLL - mit allen klassischen Kriterien charakterisiert - eine t(11;14) aufweisen.

Molekulargenetik

Mutierter *IGHV*-Status bei der Mehrzahl der CLL-Patienten

Etwa 60% aller CLL-Patienten weisen einen mutierten *IGHV*-Status auf. Dabei wird die Last der somatischen Hypermutationen in einem spezifischen Teil des B-Zellrezeptors - dem sogenannten *IGHV* (*immunoglobulin heavy chain variable*)-Gen - im Vergleich zur ursprünglichen DNA-Sequenz bestimmt. Ein Vorhandensein von 2% oder weniger Mutationen wird als „unmutiert“ und ein Vorhandensein von mehr als 2% Mutationen als „mutiert“ bezeichnet. Da sich das Ergebnis der *IGHV*-Mutationsanalyse für eine spezifische CLL-Population im Verlauf nicht verändert, ist eine mehrmalige Analyse im Regelfall nicht notwendig. Neuere Studien deuten darauf hin, dass ein Teil der Patienten ähnliche Muster im B-Zellrezeptor, eine sogenannte Stereotypie, aufweisen.

Mutationen in *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *ATM* und *BIRC3*

TP53-Gen

Bei *TP53*-Veränderungen muss zwischen Mutationen und Deletionen (17p-) unterschieden werden. *TP53*-Mutationen sind Veränderung der Basenabfolge innerhalb des Gens und können nur mittels Sequenzierung nachgewiesen werden. Bei einer *TP53*-Deletion kommt es zum Verlust von genetischem Material des kurzen Armes von Chromosom 17 (17p), welcher das gesamte Gen überspannt und mittels FISH, bei entsprechender Größe auch mittels Chromosomenanalyse, nachgewiesen werden kann. Bei Erstdiagnose beträgt die Inzidenz von *TP53*-Mutationen ca. 8%. *TP53*-Deletionen treten bei etwa 4% auf, zumeist in Kombination mit einer *TP53*-Mutation aber jeweils auch allein (Zenz et al. 2010). Um den *TP53*-Status eines Patienten umfassend zu klären, empfiehlt es sich somit sowohl eine FISH-Analyse für 17p- als auch eine Mutationsanalyse durchzuführen. In fortgeschrittenen Stadien und bei refraktärer CLL steigt die Häufigkeit der *TP53*-Veränderungen deutlich an.

SF3B1-Gen

SF3B1-Mutationen kommen bei ca. 6% der CLL-Patienten vor. Die Inzidenz ist bei refraktären CLL Patienten deutlich erhöht. *SF3B1*-Mutationen korrelieren mit einem unmutierten *IGHV*-Status, *ATM*-Veränderungen und einem stereotypen *IGHV3-21*-Rearrangement. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass diese Mutationen mit einer intermediären Prognose assoziiert sind (Oscier et al. 2013, Stilgenbauer et al. 2014, Jeromin et al. 2014).

NOTCH1-Gen

NOTCH1-Mutationen kommen gehäuft bei CLL mit einem unmutierten *IGHV*-Status vor und in Zusammenhang mit Trisomie 12. *NOTCH1*-Mutationen werden bei etwa 10% der CLL-Erstdiagnosen beobachtet und sind mit einem etwa 20-fach erhöhten Risiko für eine Transformation in ein DLBCL assoziiert. Es gibt Hinweise darauf, dass Patienten mit *NOTCH1*-Mutationen eine intermediäre Prognose aufweisen und keinen Nutzen von der Zugabe von Rituximab zur Chemotherapie mit Fludarabin/Cyclophosphamid erfahren (Stilgenbauer et al. 2014). Allerdings muss dies noch in weiteren unabhängigen Studien bestätigt werden.

ATM-Gen

ATM-Veränderungen können sowohl durch Mutationen als auch Deletionen (11q-) verursacht werden. Mutationen treten bei ca. 6% der CLL-Patienten bei Diagnose auf. Deletionen von 11q22 beinhalten immer das *ATM*-Gen. In etwa 30% der Fälle mit einer 11q-Deletion findet sich auch eine *ATM*-Mutation. Diese Patienten zeigen eine intermediäre Prognose, wobei es Hinweise darauf gibt, dass beim gleichzeitigen Auftreten einer Deletion und einer Mutation eine ungünstigere Prognose zu erwarten ist als mit nur einer *ATM*-Veränderung (Austen et al. 2007, Skowronska et al. 2012). Das eingeschränkte Ansprechen auf Chemotherapie bei Patienten mit *ATM* Veränderung scheint durch die Zugabe von Rituximab verbessert werden zu können (Stilgenbauer et al. 2014). Da das Gen sehr groß und daher aufwendig zu sequenzieren ist, empfiehlt sich eine Analyse nur bei speziellen Fragestellungen.

***BIRC3*-Veränderungen** können in *BIRC3*-Mutationen und *BIRC3*-Deletionen unterteilt werden. Die Inzidenz von *BIRC3*-Veränderungen bei Erstdiagnose liegt bei 4%, bei refraktären Patienten ist sie jedoch höher. Das Gen *BIRC3* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 11 in der Nähe des *ATM*-Gens. Bei 80% der CLL-Patienten mit einer *ATM*-Deletion ist *BIRC3* ebenfalls deletiert. Für Patienten mit *BIRC3*-Veränderungen wird eine ungünstige Prognose angenommen (Rossi et al. 2013).



Tabelle 1: Häufigkeit der Mutationen zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf
(Rossi et al. 2013, Guièze & Wu 2015)

Gen	TP53	SF3B1	NOTCH1	ATM	BIRC3
Diagnose	8%	6%	10%	6%	4%
Therapie-bedürftig	10%	18%	10%	14%	-
refraktär/rezidivierend	31%	38%	15%	25%	15%

Prognose

IGHV-Status ist wichtiger prognostischer Marker der CLL

Der IGHV-Status ist ein sehr wichtiger prognostischer Marker bei der CLL. Der unmutierte Status ist bereits im frühen Stadium der CLL mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. Eine Ausnahme stellt der IGHV-Locus 3-21 dar, der mutationsunabhängig mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Entsprechendes gilt für TP53-Mutationen. Diese finden sich bei bis zu 10% aller CLL und gehen häufig mit 17p/TP53-Deletionen einher, korrelieren aber unabhängig davon mit einer ungünstigen Prognose.

Das Vorhandensein eines stereotypen B-Zellrezeptors kann ebenfalls Auswirkungen auf die Prognose haben. Kürzlich wurde gezeigt, dass Patienten mit einem stereotypen IGHV3-21-Rearrangement unabhängig vom Mutationsstatus eine deutlich verkürzte Zeit bis zur Behandlung aufweisen (Baliakas et al. 2015, Jeromin et al. 2016). Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Prognose durch zusätzlich vorliegende molekulare und zytogenetische Veränderungen moduliert wird (Jeromin et al. 2016).

FISH-Aberrationen haben prognostische Bedeutung

Die mittels FISH nachgewiesenen Aberrationen haben prognostische Bedeutung. Döhner et al. (2000) entwickelten ein hierarchisches Modell, wobei beim Auftreten von mehreren Aberrationen die Prognose von der ungünstigsten genetischen Veränderung bestimmt wird (siehe Tabelle 4). Das Vorliegen einer 17p-Deletion oder einer 11q-Deletion zeigt einen im Vergleich zum "normalen Karyotyp" im FISH ungünstigeren Krankheitsverlauf an, während das alleinige Vorliegen einer 13q-Deletion mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist. Patienten mit einer Trisomie 12 zeigen eine ähnliche Prognose wie solche mit normalem Karyotyp.

Tabelle 2: Prognostische Relevanz genetischer Veränderungen

	Mediane Überlebenszeit nach Döhner et al. in Monaten	Prognose
17p-Deletion	32	ungünstig
11q-Deletion	79	
+ 12	114	
"normal" (keine Aberrationen mittels FISH-Panel nachweisbar)	111	
13q-Deletion (allein)	133	günstig

Chromosomenbandenanalyse liefert weitere prognostische Informationen

Die Chromosomenbandenanalyse kann zusätzlich zur FISH-Untersuchung weitere prognostische Informationen liefern. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein komplex aberranter Karyotyp ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, der sogar den prognostischen Effekt von TP53-Alterationen übertreffen kann (Herling et al. 2016).

TP53-Mutationen haben ungünstige Prognose

Eine ungünstige Auswirkung auf das Gesamtüberleben und die Zeit bis zur Behandlung wurde für TP53-Veränderungen gezeigt. Die Inzidenz von TP53-Mutationen beträgt 8-12% und von TP53-Deletionen 4-7%, jedoch ist sie in fortgeschrittenen Stadien und bei refraktärer CLL deutlich höher (Döhner et al. 2000, Stilgenbauer et al. 2014, Zenz et al. 2010). Liegt ein TP53-Allel mutiert, das andere deletiert vor, so dass kein funktionsfähiges TP53 gebildet werden kann, führt dies zu einem additiv negativen Effekt (Stengel et al. 2016). Selten kommt es zu biallelischen Mutationen oder monoallelischen Mutationen mit CN-LOH (copy-neutral loss of heterozygosity) mit dominant negativem Effekt (Goh et al. 2011).

Das prognostische Panel nach Rossi

Das prognostische Panel nach Rossi et al. 2013 berücksichtigt sowohl molekulargenetische als auch zytogenetische Marker. Patienten werden in vier Risikogruppen eingeteilt:

- **Hochrisiko:** TP53 bzw. BIRC3-Veränderungen
- **Intermediäres Risiko:** NOTCH1 bzw. SF3B1-Mutationen bzw. 11q-Deletion
- **Niedriges Risiko:** Trisomie 12 oder normaler Karyotyp
- **Sehr niedriges Risiko:** alleinige 13q-Deletion

Dieses Modell lässt sich sowohl bei Erstdiagnose als auch im Verlauf anwenden.

Auch Subklone mit Mutationen (insbesondere im Gen TP53) zeigen denselben ungünstigen Verlauf wie Patienten mit entsprechender Veränderung im Hauptklon (Landau et al. 2013, Rossi et al. 2014). Die Next-Generation Sequenzierung ermöglicht es, diese subklonalen Mutationen bis zu einer klinisch relevanten Mutationslast von ca. 3% zu detektieren.



Assoziationen zwischen genetischen Veränderungen und Prognosemarkern

Es finden sich Assoziationen zwischen molekularzytogenetischen Veränderungen (im FISH) und anderen prognostischen Markern. So tritt die mit einer ungünstigen Prognose assoziierte CD38-Positivität (Hamblin et al. 2000, Ibrahim et al. 2001, Jelinek et al. 2001) gehäuft zusammen mit einer höheren Anzahl an FISH-Aberrationen und mit Hochrisikofaktoren (17p-, 11q-) auf. Ferner finden sich Assoziationen zwischen 11q-Deletionen sowie 17p-Deletionen und einem unmutierten *IGHV*-Status (Stilgenbauer et al. 2002; Kröber et al. 2002). Diskutiert werden seit kurzem Assoziationen von *SF3B1*-Mutationen mit 11q-Deletionen sowie *NOTCH1*-Mutationen mit Trisomie 12.

Außerdem ist der Nachweis der Expression von CD38 sowie der zytoplasmatischen Expression von *ZAP70* mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Diese Parameter treten heute aber in ihrer klinischen und therapeutischen Relevanz in den Hintergrund.

Therapie

Zytogenetische und molekulare Veränderungen haben Einfluss auf die Therapieentscheidung

Zytogenetische Veränderungen erlauben nicht nur eine Einschätzung der Prognose. Zunehmende Daten weisen vielmehr daraufhin, dass auch eine Einschätzung des Ansprechens auf bestimmte Therapien anhand der zytogenetischen Veränderungen möglich ist. Dies ist von großer Bedeutung, da aktuell viele neue Substanzen Einzug in die CLL-Therapie gefunden haben, deren Wirksamkeit ebenfalls in Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter genetischer Aberrationen variiert (Hallek 2013; Byrd et al. 2015; O'Brien et al. 2015; Roberts et al. 2016; Onkopedia Leitlinie CLL).

Del(17p13) und TP53-Mutationen beeinflussen Wahl der Erstlinientherapie

Del(17p13) und *TP53*-Veränderungen sind derzeit die einzigen Prognosemarker, die schon direkt einen Einfluss auf die erste Therapieentscheidung haben. So ist das Vorliegen von *TP53*-Mutationen und/oder *TP53*-Deletionen prognostisch ungünstig und mit einer geringeren Ansprechrate auf üblicherweise verwendete Standard-Chemotherapien assoziiert (Oscier et al. 2013; Stilgenbauer et al. 2014). Da *TP53*-Veränderungen im Krankheitsverlauf hinzukommen können, sollte eine *TP53*-Analyse vor jeder Therapieentscheidung bei einer Krankheitsprogression durchgeführt werden. So empfehlen die aktuellen Onkopedia-Leitlinien die Wahl der Erstlinientherapie in Abhängigkeit eines Vorliegens dieser genetischen Veränderungen (Onkopedia-Leitlinie CLL 2017).

Zudem gibt es Mutationen in weiteren Genen, deren Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf und Therapierelevanz zurzeit geprüft werden. Unter anderem gehören dazu mit einer Häufigkeit von jeweils unter 10% folgende: *BCOR*, *EGR2*, *FBXW7*, *MYD88*, *NRAS*, *POT1*, *KRAS*, *SAMHD1*, *XPO1*.

Resistenzentwicklung unter Ibrutinib-Therapie

Die Behandlung mit Ibrutinib kann zu der Entwicklung von Resistenzmutationen führen. Bisher bekannte davon betroffene Gene sind das *BTK*- und das *PLCG2*-Gen (Woyach et al. 2014). Da Mutationen in diesen Genen erst nach Therapiegabe nachweisbar sind, ist eine Untersuchung nur bei Nicht-Ansprechen und nicht im Vorfeld der Therapieeinleitung angezeigt.

Referenzen

Die zugehörigen Referenzen finden Sie hier:

<https://www.mll.com/diagnostisches-angebot/reife-b-zellneoplasien/chronische-lymphatische-leukaemie-cll.html#referenzen>