

Titeldia:

H. Veelken, Leiden: Diagnostik der CLL und monoklonalen B-Zell-Lymphozytose

Dia 1:

Richtlinien zur Diagnostik bei Erstdiagnose und Verlaufskontrolle der chronischen lymphatischen Leukämie sind von einer internationalen Expertengruppe formuliert worden (Hallek et al., 2008). Diese Vorschläge werden in diesem Beitrag im Hinblick auf das pathobiologische Spektrum der monoklonalen Proliferation von B-Zellen mit dem Phänotyp der CLL diskutiert.

Dia 2:

Aus Sicht der WHO-Klassifikation von Tumoren des hämatopoietischen Systems kann die CLL als neoplastische, aber indolente klonale Expansion von reifen B-Zellen mit einem charakteristischen Phänotyp definiert werden. Der CLL-Phänotyp unterscheidet sich von normalen B-Zellen durch die aberrante Koexpression von CD5 bei gleichzeitiger Expression von CD23. Der B-Zellmarker CD20 sowie der B-Zellrezeptor sind auf der Zellmembran hingegen nur relativ schwach exprimiert.

Lymphatische Neoplasien werden in der WHO-Klassifikation als "real existierende", biologische Entitäten voneinander abgegrenzt. Hierfür werden grundsätzlich **4 Kriterien** herangezogen: Das (1) **klinische Erscheinungsbild**, die (2) zytologische und histologische **Morphologie**, sowie (3) der **Immunphänotyp** und (4) **genetische Aberrationen** der neoplastischen Zellen.

Dia 3:

1) Klinik: Die CLL ist prinzipiell eine indolente Erkrankung. Ca. 40% der Patienten sind bei Erstdiagnose beschwerdefrei, so dass die CLL häufig eine Zufallsdiagnose ist. Unter den klinischen Zeichen der CLL ist die Lymphadenopathie am häufigsten und dient als typisches Leitsymptom. Die anderen häufigen Symptome und Zeichen (Tabelle) der CLL entstehen durch zelluläre Expansion im lymphatischen System und durch eine verdrängende Infiltration des Knochenmarkes. B-Symptome kommen nur bei einer Minderheit der Patienten (10-20%) vor.

Akute Erkrankungsbilder treten als Komplikationen der CLL auf und werden durch Infekte, Autoimmunphänomene des hämatopoietischen Systems (Immunthrombopenie, Autoimmunhämolyse), oder die Transformation in ein aggressives Lymphom (sog. Richter-Syndrom) verursacht.

Dia 4:

Bei der klinischen Charakterisierung ist auch die Epidemiologie der CLL zu berücksichtigen. Die CLL wird am häufigsten in der 7. Lebensdekade diagnostiziert. Bei einem Geschlechterverhältnis von ca. 1,4:1 sind Männer mässig häufiger betroffen (Morton et al., 2006).

Die Ätiologie der CLL ist weitgehend unbekannt. Eine geringe Inzidenz in Asien, die Existenz familiärer Häufung mit einem etwa 8fach erhöhtem Risiko (Goldin et al., 2009) und die Identifizierung CLL-assoziiierter Genloci (Crowther-Swanepoel et al., 2010; Di Bernardo et al., 2008) belegen jedoch eine genetische Prädisposition.

Mit einer Inzidenz von ca. 5 stellt die CLL nach dem diffusen grosszelligen B-Zell-Lymphom und Plasmazell-Neoplasien die dritthäufigste lymphatische Tumorerkrankung dar (Morton et al., 2006). Die vielfach angetroffene Charakterisierung als "häufigste Leukämie der westlichen Welt" ist somit unter der modernen biologisch-nosologischen Perspektive unzutreffend und sollte nicht mehr verwendet werden: Der Begriff "Leukämie" definiert heutzutage keine Erkrankungsgruppe mehr, sondern allein das Phänomen einer klinisch führenden Ausschwemmung kernhaltiger maligner hämatopoietischer Zellen in das periphere Blut. Die CLL ist hingegen als Lymphom mit meist leukämischem Verlauf aufzufassen.

Dia 5:

Aufgrund der relativ langen mittleren Lebenswartung von CLL-Patienten mit ca. 10 Jahren hat die CLL allerdings wahrscheinlich die höchste Prävalenz aller Lymphome: Die Prävalenz kann aufgrund populationsbezogener Studien auf 20-50 geschätzt werden (Morton et al., 2006; Watson et al., 2008).

Dia 6:

2) Morphologie: Die neoplastischen Zellen der CLL werden meist im Ausstrich des peripheren Blutes beurteilt. Charakteristisch ist die absolute Vermehrung von reifen Lymphozyten (Zellgrösse um 10-12 μm , rund-ovaler Kern, dichtes Kernchromatin, wenig Zytoplasma, kaum erkennbare Nucleoli). Eine Minderheit von Prolymphozyten (lymphoide Zellen von etwa doppelter Grösse, etwas aufgelockertes Karyoplasma, deutlicher Nukleolus, deutlich mehr Zytoplasma) kommt regelhaft vor. Sehr typisch ist das Vorkommen von Gumprecht'schen Kernschatten, die durch eine mechanisch verminderte Stabilität der CLL-Zellen beim Ausstreichen entstehen. Bei einer ausgeprägten Lymphozytose und Vorkommen solcher Kernschatten kann die Verdachtsdiagnose einer CLL mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit gestellt werden.

Dia 7:

Eine Quantifizierung der Kernschatten, die allerdings ein standardisiertes apparatives Ausstrichverfahren voraussetzt (Nowakowski et al., 2009), liefert auch bereits prognostische Informationen: Ein hoher Anteil von Kernschatten, der vermutlich einfach einen biologisch generell wenig widerstandsfähigen Zellklon reflektiert, ist mit einem besseren Langzeitüberleben assoziiert.

Dia 8:

Bei asymptomatischen Patienten sind eine Lymphozytose von mehr als 5000/ μl und deren Fortbestand über ein Zeitraum von mindestens 3 Monaten formale Voraussetzungen für die Diagnose einer CLL. Diese speziellen Kriterien müssen jedoch nicht erfüllt sein, wenn klinische Zeichen oder Symptome einer CLL (s.o.) bestehen.

Ausser der typischen, leukämischen Form der CLL tritt dieselbe Erkrankung auch in etwa 5% aller Fälle in nodaler Verlaufsform auf, d.h. mit führender Lymphadenopathie, quantitativ geringer Lymphozytose und ohne weitere Abnormalitäten des Blutbildes. Diese Verlaufsform der CLL wird üblicherweise als kleinzelliges lymphozytisches Lymphom (SLL) bezeichnet. Die Diagnose des SLL erfordert in der Regel eine Lymphknotenbiopsie. In befallenen Lymphknoten bilden die CLL-Zellen follikelartige proliferative Zentren aus, in denen Sie in

enger Interaktion zu T-Zellen stehen und in wechselnder Frequenz den Proliferationsmarker Ki-67 exprimieren.

Dia 9:

3) Immunphänotyp: Die Sicherung der Diagnose einer CLL erfordert den Nachweis des typischen CLL-Immunphänotyps, für den die Durchflusszytometrie peripherer Blutzellen die optimale Methode darstellt. Der Matutes-Score (Matutes et al., 1994) bewertet neben starker Expression von CD5 und CD23 auch die Negativität für das Cholesterin-abhängige CD20-Epitop FMC7 (Polyak et al., 2003) sowie schwache Expression von CD22 und IgM auf der Zelloberfläche. Das Vorliegen von mindestens 4 dieser 5 Merkmale gilt als zuverlässiges Kriterium für das Vorliegen einer CLL. Genau genommen bezieht sich der Grenzwert von >5000 Lymphozyten/ μ l für die Diagnose der CLL allein auf klonale B-Zellen mit CLL-Phänotyp und nicht auf die gesamte Lymphozytenzahl. Diese Genauigkeit ist nicht ganz unwesentlich, da eine CLL regelhaft auch mit einer Expansion von T-Zellen mit aktiviertem Phänotyp, aber funktionell eingeschränkter Kompetenz einhergeht.

Dia 10:

Die bislang diskutierten klinischen, morphologischen und immunphänotypischen Merkmale der CLL ermöglichen in den meisten Fällen eine zuverlässige Abgrenzung der CLL von anderen leukämischen B-Zell-Lymphomen.

Die prognostisch deutlich schlechtere Prolymphozytenleukämie (PLL) ist durch einen morphologisch bestimmten Anteil von Prolymphozyten von >55% definiert; die Expression von CD5 kann zudem fehlen.

Bei der Haarzell-Leukämie (HCL) ist klinisch zumeist die Splenomegalie anstelle der Lymphadenopathie führend. Die charakteristischen, namensgebenden Ausziehungen des Zytoplasmas der lymphatischen Zellen können bei der morphologischen Begutachtung des Blutausstrichs auch allein diagnoseweisend sein. Ausschlaggebend für die Diagnose der HCL ist jedoch ihr sehr distinkter Immunphänotyp mit Expression von CD103 und CD25.

Die Durchflusszytometrie grenzt auch das splenische Marginalzonenlymphom (sMZL) zuverlässig von CLL und HCL ab, während beispielsweise die Unterscheidung von sMZL und HCL aufgrund von Klinik und Morphologie hingegen fast unmöglich sein kann.

Bei leukämischem Verlauf eines lymphoplasmozytischen Lymphoms ist die Differentialdiagnose zur CLL neben morphologischen Merkmalen einer zunehmenden Differenzierung (vermehrtes basophiles Zytoplasma, eher exzentrisch gelegener, runder Kern) ebenfalls anhand der Expression von CD5 möglich.

Selbst bei durchflusszytometrischer Analyse kann allerdings die Abgrenzung der CLL vom Mantelzell-Lymphom (MCL), speziell bei schwacher Expression von CD23, Probleme aufwerfen. Das MCL verläuft häufig leukämisch und ist zytomorphologisch schwer von indolenten Lymphomen abzugrenzen. MCL und CLL teilen zudem die aberrante Expression von CD5. Daher gibt es immer wieder Fälle von MCL, die initial als CLL fehldiagnostiziert werden und erst wegen eines auffallend ungünstigen Verlaufes erkannt werden. Eine zuverlässige Differenzierung zwischen diesen beiden wichtigen Entitäten leukämisch verlaufender B-Zell-Lymphome ist daher im Einzelfall nur aufgrund genetischer Untersuchungen möglich.

Dia 11:

4) Genetische Aberrationen: In CLL-Zellen kommen verschiedene rekurrente genetische Aberrationen vor, die z.T. erhebliche prognostische Relevanz besitzen (Dohner et al., 2000). Hierbei handelt es in der Mehrzahl um Zugewinn oder Verlust an genetischem Material in bestimmten Loci, so dass sich die gezielte Analyse von 4 Regionen (13q14, 12q, 11q22.3, 17p13) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Nachweismethode mit guter Sensitivität und exzellenter Spezifität durchgesetzt hat. Auf die spezielle prognostische und prädiktive Relevanz dieser Loci wird in den weiteren Vorträgen dieser Sitzung (DGHO-Jahrestagung 2010) noch eingegangen und wird hier deswegen nicht vertieft. Ein Screening auf CLL-assoziierte genetische Aberrationen mittels des typischen FISH-Sondenpanels wird bei Diagnosestellung nicht generell empfohlen (Hallek et al., 2008). Der Nachweis einer typischen CLL-assoziierten Aberration kann in Zweifelsfällen die Diagnose einer CLL jedoch entscheidend stützen. Da rekurrente balancierte Translokationen bei der CLL insgesamt recht selten vorkommen (Dicker et al., 2006), spielt die klassische zytogenetische Untersuchung bei der CLL nur eine untergeordnete Rolle.

Dia 12:

Für eine komplette, genomweite Untersuchung auf Deletionen oder Amplifikationen bieten sich bei der CLL heutzutage besonders SNP (single nucleotide polymorphism)-Microarrays an. Diese Untersuchung differenziert nicht nur mono- von biallelischen Deletionen, sondern hat auch eine rekurrente Amplifikation von 12p16 mit den Kandidaten-Zielgenen *REL* und *BCL11A* als neue CLL-assoziierte genetische Aberrationen identifiziert (Pfeifer et al., 2007). SNP Arrays identifizieren auch sekundäre Aberrationen und Regionen mit Kopien-neutralen Verlust von Heterozygotität in CLL-Zellen mit hoher Genauigkeit, deren prognostische Relevanz allerdings noch unklar ist.

Dia 13:

Der Nachweis von CLL-typischen genetischen Aberrationen einerseits bzw. der MCL-assoziierten t(11:14) andererseits erlaubt somit die zweifelsfreie Abgrenzung beider Lymphome auch bei untypischem Immunphänotyp oder anderen diagnostischen Zweifelsfällen.

Dia 14:

Nach Sicherung der Diagnose einer CLL empfehlen sich an Labordiagnostik noch die Klärung einer evtl. vorhandenen latenten Hämolyse und ein Viruscreening. Wie bei anderen Lymphomen dient die Analyse der Serum-Immunglobuline der Untersuchung auf Vorliegen einer Paraproteins und der Abschätzung der Infektanfälligkeit.

Weitere, allerdings nicht-obligate Untersuchungen von prognostischer Relevanz sind bei Erstdiagnose die Bestimmung der Serumparameter Thymidinkinase, lösliches CD23 und β 2-Mikroglobulin. Die ebenfalls prognostisch wichtige Bestimmung des Mutationsstatus des klonalen Gens der schweren Immunglobulinkette (*IGHV*) erfordert eine PCR-gestützte Sequenzierung. Eine weitere fakultative Untersuchung ist die durchflusszytometrische Messung der Expression des ZAP-70-Proteins auf den CLL-Zellen. Diese Bestimmung ist allerdings nur schlecht standardisierbar und erfordert neben der obligaten Parallelmessung von negativen und positiven Kontrollenzellen ein sehr sorgfältiges Setzen der Gates, um den

festgesetzten Cut-off von 20% ZAP-70-exprimierenden Zellen hinreichend genau zu erkennen (Rassenti et al., 2004).

Neben den Laboruntersuchungen wird zum Staging eine körperliche Untersuchung mit exaktem Lymphknoten- und Milzstatus, Röntgenaufnahme des Thorax in 2 Ebenen und Abdomensonographie benötigt. Eine Schnittbildgebung ist hingegen in der Regel nicht erforderlich. Auch eine Knochenmarkpunktion ist angesichts der obligaten Knochenmarkbeteiligung einer CLL nur erforderlich, wenn bei unproportional ausgeprägter Thrombozytopenie die Abgrenzung zwischen Immunthrombopenie-Komponente und hochgradig verdrängender Knochenmarkinfiltration erforderlich scheint oder der Verdacht auf eine Richter-Transformation besteht. Nach den Konsensus-Richtlinien (Hallek et al., 2008) wird eine Knochenmarkuntersuchung zudem bei Einleitung einer Behandlung empfohlen.

Dia 15:

Wenn im peripheren Blut monoklonale B-Zellen zirkulieren, deren Anzahl weniger als 5000/ μ l beträgt und keine CLL-assoziiierbaren Symptome oder Zeichen bestehen, liegt definitionsgemäss keine CLL, sondern eine monoklonale B-Lymphozytose (MBL) vor.

Dia 16:

Als Kriterium für Monoklonalität wird das Verhältnis von B-Zellen mit Expression der beiden Typen kappa und lambda der leichten Immunglobulinketten herangezogen. Liegt das Verhältnis von kappa- zu lambda-exprimierenden Zellen über 3:1 oder unter 0,3:1, wird eine monoklonale Expansion postuliert. 80% der MBL-Fälle besitzen den typischen Immunphänotyp der CLL (Marti et al., 2005).

Dia 17:

Die Prävalenz der MBL ist ca. 100fach höher als die der CLL (Rawstron et al., 2008; Rawstron et al., 2002). Sie steigt mit zunehmenden Alter und ist bei erstgradigen Verwandten von CLL-Patienten noch weiter erhöht (Rawstron et al., 2007). Weniger überraschend ist die Tatsache, dass bei praktisch allen CLL-Patienten zum Teil lange vor der Erstdiagnose eine MBL vorgelegen hat (Landgren et al., 2009).

Dia 18:

Bei der MBL werden hinsichtlich der bekannten biologischen Risikofaktoren der CLL die prognostisch günstigen Genotypen (del13q14, Trisomie 12, mutiertes klonal rearrangiertes *IGHV*-Gen) häufig angetroffen, die ungünstigen (del17p, del11q22, unmutiertes *IGHV*) hingegen sehr selten. Die Progressionsrate der MBL zu einer behandlungspflichtigen CLL wird für Patienten, die bereits eine Lymphozytose aufweisen, auf ungefähr 1,1% pro Jahr geschätzt (Rawstron et al., 2008). Die Progressionstendenz steigt zudem mit höherer Anzahl klonaler B-Zellen. Für MBL-Personen ohne Lymphozytose liegen keine Verlaufsuntersuchungen vor.

Damit entspricht zumindest ein Teil der MBL-Fälle wahrscheinlich einer präklinischen Form der CLL. Ob eine MBL-Untergruppe existiert, die sich pathobiologisch von einem Frühstadium der CLL unterscheidet und damit eine klonale Expansion praktisch ohne relevantes Malignitätspotential darstellt, kann aufgrund der aktuell verfügbaren Daten noch nicht endgültig entschieden werden.

Dia 19:

Sofern der Anteil monoklonaler B-Zellen nicht zu gering ist, kann eine MBL durchflusszytometrisch durch die Analyse der Immunglobulin-Leichtkettenrestriktion im Gate der CD5/CD19-doppelt positiven Zellen leicht erkannt werden. Dies wird hier in einem Verdünnungsexperiment von 3% und 1% lambda-exprimierenden CLL-Zellen in normalem Blut demonstriert.

Dia 20:

Um eine MBL mit optimaler Sensitivität zu erkennen, ist allerdings eine aufwendigere 6 Farben-Analyse erforderlich. Hierbei werden zunächst B-Zellen mittels CD19, Forward- und Side-Scatter gated. Anschliessend werden separat die Zellen in Gates für CD5/CD19-doppelt-positive, CD5-positiv/CD79b-niedrig- bzw. CD5-positiv/CD20-niedrig-exprimierende Zellen analysiert. In einer normalen Blutprobe, in der sowohl CD5-positive und -negative B-Zellen ein physiologisches kappa/lambda-Verhältnis aufweisen (rechter unterer Dot Plot), finden sich in den beiden letzteren Gates praktisch keine Zellen.

Dia 21:

Bei einer MBL hingegen treten in diesen drei Gates distinkte Zellpopulationen auf, die zwar durchaus unterschiedliche Anteile ausmachen können, in der Leichtkettenanalyse dann aber jeweils als monoklonal erkannt werden können.

Dia 22:

Insgesamt stellen die monoklonalen Proliferationen von reifen B-Zellen mit CLL-Phänotyp ein Spektrum von Neoplasien von deutlich unterschiedlicher Aggressivität bzw. Malignitätspotential dar. Die Lymphozytenzahl als gegenwärtiges Hauptdifferenzierungskriterium zwischen CLL und MBL, hier auf der x-Achse dargestellt, erscheint bei Berücksichtigung der heutzutage bekannten pathobiologischen und prognostisch relevanten individuellen Faktoren der CLL als willkürlich. Dieses Kriterium ist besonders im zeitlichen Verlauf naturgemäss zu variabel, um für den Betroffenen sinnvoll zwischen maligner „Leukämie“ und „Laborbefund unklarer Signifikanz“ zu unterscheiden.

Zukünftig sollte daher eine biologisch relevantere Diskriminierung zwischen maligner Leukämie und eher benigner klonale Expansion aufgrund von pathophysiologischen Merkmalen des individuellen Klons die numerische Lymphozytenzahl ersetzen. Solche Krankheitscharakteristika werden hier konzeptionell als y-Achse dargestellt. Eine biologische Subtypisierung gehört bei anderen hämatologischen Neoplasien, besonders beispielsweise bei der akuten myeloischen Leukämie, bereits zur klinischen Routine. Auch die moderne Definition des multiplen Myeloms beruht nicht mehr auf quantitativen Kriterien, sondern auf der Kombination von klonaler Plasmazellpopulation und Zielorganschaden („CRAB“: Hypercalcaemie, Nierenschaden, Anaemie, Knochenschaden).

Dia 23:

Ein distinkter Subtyp der CLL lässt sich heute bereits durch Beeinträchtigung der p53-Funktion abgrenzen, der durch die del17p13 oder Punktmutationen des *P53*-Genlocus (Zenz et al., 2010) definiert ist. Dieser CLL-Genotyp ist durch ein meist unmutiertes *IGHV*, schlechtes Ansprechen auf zytoreduktive Therapie, und schlechte Prognose

gekennzeichnet. Aufgrund einer raschen Wachstumskinetik (durch bereiten Pfeil symbolisiert) wird das MBL-Stadium vermutlich so zügig durchlaufen, dass es selten erfasst wird (Rawstron et al., 2008).

Ein zweiter möglicher Subtyp kann durch die del11q22.3 definiert werden. Auch diese Fälle haben eine schlechte Prognose, sprechen jedoch auf eine kombinierte Immunchemotherapie gut an (Hallek et al., 2010) und sind daher nicht ganz so ungünstig einzustufen wie die del17p13-CLL. Möglicherweise kann auch die in ca. 5-8% der CLL-Patienten vorhandene +2p16 einen CLL-Subtyp mit schlechter Prognose abgrenzen (Letestu et al., 2010).

Am anderen Ende des biologischen CLL-Spektrums stehen B-Zell-Klone, die häufig jahrelang stabil und daher klinisch praktisch irrelevant sein können, teilweise aber quantitativ als Leukämie bezeichnet werden. Diese Klone tragen in der Mehrzahl die del13q14 und ein mutiertes *IGHV*. CLL-Klone mit Trisomie 12 oder Normalkaryotyp sind vermutlich häufiger proliferativ und besitzen damit insgesamt eher ein intermediäres Malignitätspotential.

Dia 24:

Durch einen routinemaessigen Nachweis genetischer Aberrationen lassen sich also bereits heute relevante Subtypen der CLL mit unguenstiger Prognose zuverlaessig abgrenzen (rote Markierungen).

Damit andererseits Personen mit CLL-Klonen von niedrigem Malignitätspotential (grüne Markierung) die belastende Diagnose einer Leukämie auch dann erspart bleiben kann, wenn die klonalen Zellen >5000/µl betragen, besteht die diagnostische Herausforderung in einer besseren Abgrenzung zur intermediären Risikogruppe (gelbe Markierung). Diese kann evtl. durch eine Komposit-Index erreicht werden, der die bereits bekannten genetischen Risikofaktoren (del13q14, *IGHV* Mutationsstatus), die prognostisch relevanten serologischen Parameter (TK, sCD23, b2-MG, TNFa) und zelluläre Faktoren (Expression von Ki67, p27, ZAP70, Lipoproteinlipase) in einer Formel kombiniert (Gribben, 2010). Ein derartiger Index wurde beispielsweise für CLL-Patienten im Stadium Binet A entwickelt (Chapiro et al., 2010).

Möglicherweise können jedoch auch noch weitere biologische Parameter, wie Aktivierungsstatus der Signaltransduktionskaskade des B-Zell-Rezeptors, wachstumsmodulierende Einflüsse nicht-neoplastischer Zellen (z.B. T-Zellen), weitere genetische Aberrationen wie Kopien-neutraler Verlust der Heterozygotität (Pfeifer et al., 2007) oder genomische Komplexität (Kujawski et al., 2008) zu dieser Diskriminierung beitragen. Hierzu sind jedoch neue prospektive Kohortenstudien erforderlich, die auch Probanden mit sogenannter MBL-Situation einschliesst und die Vielzahl der Parameter mit geeigneten bioinformatischen Methoden wie z.B. der „principal component analyse“ auswertet.

Eine solche differenzierte Einteilung der klonalen Expansion von B-Zellen mit CLL-Phänotyp auf Basis biologischer Merkmale kann einerseits die Basis fuer die Entwicklung Pathobiologie-adaptierter Therapiekonzepte bilden. Ein Beispiel stellt der Einsatz von Alemtuzumab in der Therapie der del17p13-CLL dar (Stilgenbauer et al., 2009). Andererseits koennte eine klare Subdifferenzierung der CLL in Zukunft eine bessere Definition der Patienten mit minimalem Risiko für symptomatischen Progress und konsekutiven Therapiebedarf erlauben. Bei dieser Patientengruppe sollte dann auch erwogen werden, die Diagnose „Leukämie“ durch einen Begriff zu ersetzen, der unabhængig von der alleinigen Lymphozytenzahl der wenig-malignen Natur der Erkrankung angemessener ist.

Ausgewählte Literatur:

Chapiro, E., Leporrier, N., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Mossafa, H., Leroux, D., Tigaud, I., De Braekeleer, M., Terre, C., Brizard, F., *et al.* (2010). Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res* 34, 63-68.

Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Di Bernardo, M.C., Dobbins, S.E., Torres, M., Mansouri, M., Ruiz-Ponte, C., Enjuanes, A., Rosenquist, R., Carracedo, A., *et al.* (2010). Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet* 42, 132-136.

Di Bernardo, M.C., Crowther-Swanepoel, D., Broderick, P., Webb, E., Sellick, G., Wild, R., Sullivan, K., Vijayakrishnan, J., Wang, Y., Pittman, A.M., *et al.* (2008). A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 40, 1204-1210.

Dicker, F., Schnittger, S., Haferlach, T., Kern, W., and Schoch, C. (2006). Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 108, 3152-3160.

Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., and Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 343, 1910-1916.

Goldin, L.R., Bjorkholm, M., Kristinsson, S.Y., Turesson, I., and Landgren, O. (2009). Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 94, 647-653.

Gribben, J.G. (2010). How I treat CLL up front. *Blood* 115, 187-197.

Hallek, M., Cheson, B.D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M.J., Montserrat, E., Rai, K.R., *et al.* (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111, 5446-5456.

Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A.M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grunhagen, U., *et al.* (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 376, 1164-1174.

Kujawski, L., Ouillette, P., Erba, H., Saddler, C., Jakubowiak, A., Kaminski, M., Shedden, K., and Malek, S.N. (2008). Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 112, 1993-2003.

Landgren, O., Albitar, M., Ma, W., Abbasi, F., Hayes, R.B., Ghia, P., Marti, G.E., and Caporaso, N.E. (2009). B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 360, 659-667.

Letestu, R., Levy, V., Eclache, V., Baran-Marszak, F., Vaur, D., Naguib, D., Schischmanoff, O., Katsahian, S., Nguyen-Khac, F., Davi, F., *et al.* (2010). Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*.

Marti, G.E., Rawstron, A.C., Ghia, P., Hillmen, P., Houlston, R.S., Kay, N., Schleinitz, T.A., and Caporaso, N. (2005). Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 130, 325-332.

Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H., and Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 8, 1640-1645.

Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa, S.S., Hartge, P., Weisenburger, D.D., and Linet, M.S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107, 265-276.

Nowakowski, G.S., Hoyer, J.D., Shanafelt, T.D., Zent, C.S., Call, T.G., Bone, N.D., Laplant, B., Dewald, G.W., Tschumper, R.C., Jelinek, D.F., *et al.* (2009). Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 27, 1844-1849.

Pfeifer, D., Pantic, M., Skatulla, I., Rawluk, J., Kreutz, C., Martens, U.M., Fisch, P., Timmer, J., and Veelken, H. (2007). Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 109, 1202-1210.

Polyak, M.J., Ayer, L.M., Szczeppek, A.J., and Deans, J.P. (2003). A cholesterol-dependent CD20 epitope detected by the FMC7 antibody. *Leukemia* 17, 1384-1389.

Rassenti, L.Z., Huynh, L., Toy, T.L., Chen, L., Keating, M.J., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Flinn, I.W., Rai, K.R., Byrd, J.C., *et al.* (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 351, 893-901.

Rawstron, A.C., Bennett, F., and Hillmen, P. (2007). The biological and clinical relationship between CD5+23+ monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 139, 724-729.

Rawstron, A.C., Bennett, F.L., O'Connor, S.J., Kwok, M., Fenton, J.A., Plummer, M., de Tute, R., Owen, R.G., Richards, S.J., Jack, A.S., *et al.* (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 359, 575-583.

Rawstron, A.C., Green, M.J., Kuzmicki, A., Kennedy, B., Fenton, J.A., Evans, P.A., O'Connor, S.J., Richards, S.J., Morgan, G.J., Jack, A.S., *et al.* (2002). Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 100, 635-639.

Stilgenbauer, S., Zenz, T., Winkler, D., Buhler, A., Schlenk, R.F., Groner, S., Busch, R., Hensel, M., Duhrsen, U., Finke, J., *et al.* (2009). Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 27, 3994-4001.

Watson, L., Wyld, P., and Catovsky, D. (2008). Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol* 81, 253-258.

Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Habe, S., Winkler, D., Buhler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., *et al.* (2010). TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 28, 4473-4479.