

Anwendungen der Durchflußzytometrie in der Leukämie- und Lymphomdiagnostik

W.Hübl

I. ALLGEMEINE ÜBERLEGUNGEN

Für die Diagnose vieler hämatologischer Erkrankungen kann die Immunphänotypisierung ein mehr oder weniger großer Mosaikstein sein. Morphologische, zytochemische, zytogenetische, molekularbiologische und klinische Untersuchungen sind die wesentlichsten anderen Komponenten.

CHRONISCH LYMPHOPROLIFERATIVE ERKRANKUNGEN

B-Zellreihe: durch die Möglichkeit, die Klonalität der Zellen mittels Kappa/Lambda-Leichtkettenanalyse festzustellen (und dies mittels Mehrfarbenanalyse auch bei sehr kleinen Subpopulationen) hat die Durchflußzytometrie einen hohen Stellenwert in der Erkennung von malignen B-Zellerkrankungen. Nicht nur in Blut und Knochenmark, auch in Lymphknoten oder anderem Biopsiematerial erreicht die Durchflußzytometrie eine hohe Sensitivität. Bei typischem Phänotyp kann man durchflußzytometrisch auch eine bestimmte Entität definieren (z.B. typische chronisch lymphatische oder Haarzelleukämie), in den meisten Fällen braucht es hierzu aber die Ergänzung durch andere Untersuchungen.

T-Zellreihe: hier ist die Sensitivität der Durchflußzytometrie weit geringer, da ein Monoklonalitätsnachweis derzeit noch nicht etabliert ist. Bleibt der Nachweis abnormer Verteilungen und Antigenexpressionen. Dies wird aber dadurch erschwert, daß einerseits nicht alle malignen T-Zellerkrankungen einen abnormen Phänotyp haben, und andererseits auch bei nicht malignen Erkrankungen oder beim Gesunden relativ hohe Konzentrationen von T-Zellen vorkommen, die einen "abnormen" Phänotyp haben (z.B. CD7-/CD4+, CD5-/CD3+). Die Detektion der malignen T-Zellproliferationen ist daher nicht sehr sensitiv. Steht die Diagnose (T-Zell)lymphom durch andere Befunde fest, kann die Durchflußzytometrie Hinweise auf die exakte Definition der Erkrankung liefern.

NK/LGL-Zellreihe: Studien, die durchflußzytometrische Besonderheiten maligner NK/LGL-Zellen beschreiben, sind nicht überzeugend. Die Durchflußzytometrie kann die NK-Zellen erkennen und quantifizieren, eine Unterscheidung bezüglich der Dignität ist aber nicht möglich.

AKUTE LEUKÄMIEN

Die Durchflußzytometrie kann zur Morphologie nur eine sehr eingeschränkte Aussage machen (Vorwärtsstreulicht läßt auf die Größe, Seitwärtsstreulicht auf die Granularität der Zellen schließen). Daher ist es nicht sinnvoll, nach dem durchflußzytometrischen Ergebnis eine Einteilung nach FAB-Kriterien durchzu-

führen zu wollen. Es lassen sich zwar einzelne Kategorien (z.B. M3) als wahrscheinlich oder unwahrscheinlich definieren, letztlich bleibt die exakte Einteilung aber der Morphologie und Zytochemie überlassen. Ausnahmen stellen die M0, die M7 und manche Formen der M6 dar, bei denen morphologisch keine sichere Aussage getroffen werden kann.

Ziel der durchflußzytometrischen Untersuchung bei akuten Leukämien ist primär die Ermittlung der Linie der Leukämie (lymphatisch, myeloisch).

Da die Durchflußzytometrie wesentlich einfacher als die molekularbiologischen Verfahren und wesentlich sensitiver als die morphologische Untersuchung ist, eignet sie sich auch zur Verlaufskontrolle akuter Leukämien, also zum Nachweis der sog. Minimal Residual Disease (minimale Resterkrankung, MRD).

Bei den akuten lymphatischen Leukämien (ALL) ist die Bedeutung der Durchflußzytometrie größer, da die derzeit gebräuchlichen Klassifikationen der ALL auf dem Markerprofil der Leukämiezellen aufbauen.

CHRONISCH MYELOPROLIFERATIVE ERKRANKUNGEN / MYELOYDYSPLASTISCHE SYNDROME

Wenn auch immer wieder Versuche gemacht werden, die durchflußzytometrische Untersuchung zur Diagnose dieser Erkrankungen einzusetzen (z.B. durchflußzytometrische Bestimmung der Alkalischen Leukozytenphosphatase; Auswertung des Musters von Scatter, CD13, CD33, CD16 und/oder 11b auf den Granulozyten zur Erkennung des MDS), ist deren praktische Bedeutung noch gering. Lediglich in der Blastenkrise wird die Durchflußzytometrie zur Linientypisierung routinemäßig eingesetzt.

II. METHODIK

Probenmaterial: meist werden Blut und Knochenmark, seltener andere Körperflüssigkeiten oder Lymphknoten/Gewebeproben zur Analyse eingesandt. Aber selbst aus einer Feinnadelaspiration kann man manchmal genug Material gewinnen, um z.B. die Klonalität eines B-Zelltumors zu beweisen. Obwohl die Durchflußzytometrie die pathologische oder zytologische Untersuchung hervorragend unterstützen kann, werden ihre Möglichkeiten jenseits von Blut und Knochenmark viel zu wenig genutzt.

1. LYSE DER ERYTHROZYTEN

Die in Blut und Knochenmarksproben vorherrschenden Erythrozyten müssen für die meisten Anwendungen vor der Analyse der Leukozyten entfernt werden.

Das kann mittels Dichtegradienten-Separation der "mononukleären" Zellfraktion erfolgen, wobei aber

auch ein nicht definierter Anteil der Granulozyten verloren geht. Dieser, in Zeiten der Einfarbfluoreszenzmessungen erwünschte bis notwendige Effekt der dadurch stattfindenden relativen Blastenvermehrung, erscheint heute nicht mehr zwingend notwendig [1]. Ein Vorteil bleibt: der Anteil der toten Zellen in der Probe wird durch Dichtegradienten-Separation vermindert.

Wir entfernen Erythrozyten durch Ammoniumchloridlyse. Die gesamte Probe wird hierbei vor der Färbung lysiert:

Bis zu 3 ml der Blut/KM-Probe werden in ein 50 ml Kulturgefäß gegeben. Danach werden 50 ml Ammoniumchloridlyse hinzugefügt. Kulturgefäß schwenken, verschließen, anschließend hinlegen. 12 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, nicht länger. Zentrifugation 400G, 10 Minuten bei 4°C. 2 x Waschen mit PBS-BSA(0.5%)-Azid (0.1%). Resuspension mit ca. 1.5 ml PBS-BSA-Azid + 200µl Newborn Calf Serum. Zellzahl messen. Lymphozahl einstellen auf ca. 3000/µl; Leuko maximal 20000/µl.

PBS: Phosphate-Buffered Saline, Sigma, # 1000-3

BSA: Bovines Serum Albumin, Sigma A-2153

Azid: Natrium Azid von Merck # 6688

NCS: Newborn Calf Serum Sigma N-4762

Ammoniumchloridlysereagenz (Haltbarkeit beschränkt, bei niedrigem Verbrauch jede Woche neu herstellen):

8.3g NH₄Cl

1.0g KHCO₃ (Kaliumhydrogencarb. ohne Hydratwasser)

ad 1000ml aqua dest

+ 200ul EDTA Stammlösung

EDTA-Stammlösung: 18.61g ad 100ml a.d. (+ ca. 2g NaOH; erhöht Löslichkeit)

Anmerkungen zur Lyse: Die nicht eiweißfixierenden Lysen wie die oben beschriebene Ammoniumchloridlyse und die Ortholyse haben gegenüber fixierenden Lysen (Facs-Lyse, Optilyse) den Nachteil, daß die Lysezeiten genauer eingehalten werden müssen, da sonst auch die Leukozyten zerstört werden könnten. Sie haben aber den großen Vorteil, daß man zuerst lysieren und danach färben/markieren kann. Nach einer fixierenden Lyse ist eine Markierung der Leukozyten problematisch. Einerseits kommt es zu unspezifischen Anfärbungen andererseits können Antigene zerstört werden [1].

Warum wir vor und nicht nach der Markierung lysieren: eine Entnahme von jeweils 100µl Knochenmark, Markierung und nachfolgende Lyse der Probe, wie es für das Blut absolut üblich und vertretbar ist, ist für Knochenmarksproben problematisch. Kommt in jedes Röhrchen eine gleich zusammengesetzte Knochenmarkspröbe? Gehen Knochenmarksstückchen überhaupt durch die enge Pipettenspitzenöffnung? Durch Lyse von 3 ml Knochenmark vor der Markierung hin-

gegen kommt es neben der Erythrozytenlyse auch zu einer Homogenisierung der Probe.

Daneben erweist es sich auch als praktisch, die Probe als Leukozytensuspension vorrätig zu haben. Sollte man Marker nachsetzen müssen, spart man sich eine neuerliche Lyse.

Anmerkung zum Waschen: Durch Zugabe der Lyse und 2x Waschen ergibt sich praktisch ein dreimaliges Waschen. Dieser Aufwand ist aber für die Lymphomdiagnostik unbedingt notwendig (eher ein Minimum), da die *Serum*-Immunglobuline sowohl von den B-Zellen entfernt als auch in der Probe verdünnt werden müssen.

2. MARKIERUNG MIT FLUOROCHROM-GEKOPPELTEN ANTIKÖRPERN

Antikörpergemische in Falconröhrchen vorlegen (mit Multikanalpipette aus vorgefertigten 4-Farbgemischen; Anmerkung: wenn man jede zweite Pipettenspitze einer Multikanalpipette verwendet, entspricht dieser Abstand bei vielen Racks dem zweier Falconröhrchen)

je Röhrchen 50µl der Zellsuspension dazugeben

30 Minuten Inkubation bei 4-6°C (Kühlschrank).

1 x Waschen mit PBS-BSA-Azid

Resuspension in PBS-BSA, wenn Analyse rasch erfolgt ansonsten in PBS-Azid-Paraformaldehyd(1%) (Sigma P-6148, zum Auflösen auf 60°C erhitzen)

3. ZYTOPLASMATISCHE/NUKLEÄRE FÄRBUNGEN

Werden mit dem Routinekit der Firma Fix&Perm von An-Der-Grub (Kaumberg, Österreich; in manchen Ländern von der Firma Caltag vertrieben) durchgeführt.

4. VORGEHEN BEI DER TYPISIERUNG

Akute Leukämien

Für die Typisierung akuter Leukämien haben sich zwei unterschiedliche Methoden konturiert: die eher in Europa empfohlene Methode der Stufendiagnostik [2], bei der zuerst ein relativ kleines Antikörperpanel zur Linienfeststellung und danach ein spezifisches kleineres Panel zur Subgruppendefinition eingesetzt wird, und die eher in den Vereinigten Staaten Befürworter findende Einstufendiagnose, bei der ein breites Panel Verwendung findet. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile.

Beispiel für die Stufendiagnostik [2]:

1. Stufe:

Zuordnung zur B- oder T-lymphatischen bzw. zur myeloischen Zellreihe:

- CD19, cytCD22, cytCD79a, CD10 sprechen für B-Zellreihe
- cytCD3, CD7, CD2 sprechen für T-Zellreihe
- CD13, CD33, CDw65, CD117, cytMPO sprechen für myeloisch
- CD34, HLA-DR, TdT nicht linienspezifisch
⇒ Entscheidung: B/T/myeloisch

2 Stufe:

falls B: CD20, CD24, cytIgM, kappa/lambda

falls T: CD1a, CD3, CD4, CD5, CD8, TCR-alpha/beta und gamma/delta

falls myeloisch: CD14, CD15, CD41, CD61, CD64, Glykophorin-A, Lysozym

CD45-Gating: Mehrere Autoren weisen auf den Wert der Verwendung von CD45 für die Beurteilung akuter Leukämien hin. Da die meisten Blasten durch fehlende oder geringe Granulation und verminderte Expression von CD45 gekennzeichnet sind, kann man sie im CD45/SSC Dot-Plot gut darstellen und damit wesentlich sauberer definieren als in einem "Blastenscattergate", wo sie u.a. mit Lymphozyten und Monozyten vermischt sind [3;4]. Die Blasten können CD45 von fast gar nicht bis etwa "granulozytenstark" exprimieren. Stören können in diesen Regionen (SSC niedrig, CD45 dim bis negativ) natürlich Basophile Granulozyten, Plasmazellen, rote Vorläufer, Debris und Thrombozytenaggregate.

Lymphoproliferative Erkrankungen

Bei den B-lymphatischen Erkrankungen steht der Nachweis der Monoklonalität im Vordergrund. Wir verwenden hierzu die Markerkombinationen Kappa/CD5/CD20/CD19, Lambda/CD10/CD20/CD19 und Kappa/Lambda/CD20/CD19. Mittels CD20, CD19, CD10, CD5 und dem Vorwärtsscatter wird versucht, die pathologische Population abzugrenzen. Mit Kappa bzw. Lambda kann dann die Klonalität bestimmt werden.

Nach unserer Erfahrung darf ein "abnormer" Phänotyp allein auf keinen Fall zur Diagnose einer neoplastischen Proliferation herangezogen werden, bevor die Monoklonalität nicht bewiesen ist. Relativ viele Patienten (auch Erwachsene) haben einen signifikanten Anteil CD5-positiver, manche auch CD10-positiver B-Zellen, ohne daß es sich dabei um klonale Proliferationen handelt (Abbildung 1).

Kappa und Lambda in verschiedenen Röhren in der gleichen Farbe zu verwenden hat den Vorteil, daß man Lambda als Negativkontrolle für Kappa verwenden kann und umgekehrt (Abbildung 2).

Hat man die Monoklonalität der Population definiert kann man meist in den anderen Röhren die übrigen für die Einteilung der NHL relevanten Marker ablesen: CD25, CD103, CD79b, CD38, CD23. Beachtet man auch die Intensität der CD20 Expression, ist die Mes-

sung von FMC7 praktisch überflüssig [5]. Auch auf CD22 verzichten wir seit der Einführung von CD79b. CD11c wird bei Hinweisen auf HZL eingesetzt.

Für die Beurteilung der T-lymphoproliferativen/NK Erkrankungen verwenden wir in erster Linie die Kombinationen CD7-CD4-CD8-CD3 (FITC-PE-PERCP-APC) und CD2-CD56-CD3-CD5. Auch CD25, CD45, CD57 und HLA-DR werden gemessen. Bei Bedarf werden die Marker CD16, ev. auch TdT und andere Marker eingesetzt.

Beurteilt werden im wesentlichen die Verteilung der Subpopulationen (z.B. CD4+, CD8+, CD56+, CD57+), die Anzahl der T-Zellen mit "ungewöhnlicher" Antigenexpression (Verlust eines Antigens oder Koexpression von CD4 und CD8) und eine ev. abnorme Expressionsstärke eines Antigens. Wie schon erwähnt, kommen T-Zellen mit

ungewöhnlicher Antigenexpression auch bei nichtmalignen Erkrankungen und beim Gesunden vor und es kann daher oft nur ein Verdacht ausgesprochen und eine molekulargenetische TCR-Rearrangementunter-

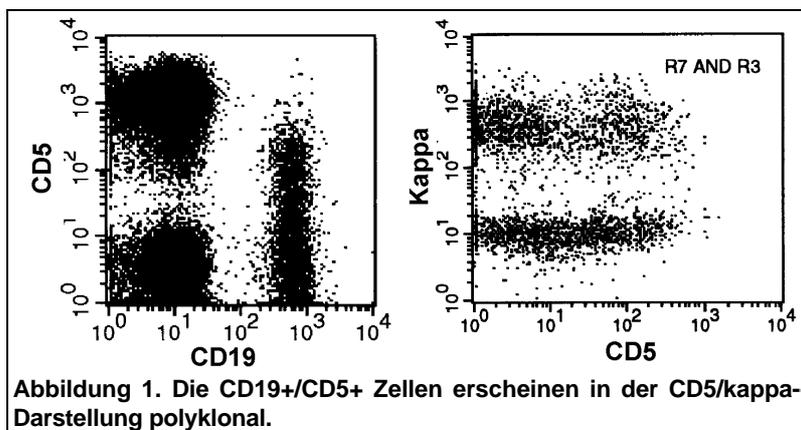


Abbildung 1. Die CD19+/CD5+ Zellen erscheinen in der CD5/kappa-Darstellung polyklonal.

suchung zum Monoklonalitätsnachweis empfohlen werden.

Myelom

Wir markieren bei Myelomuntersuchungen CD38, CD138, CD45, CD19, CD56. Liegen Plasmazellen vor, wird durch zytoplasmatische Leichtkettenanalyse (cytKappa-56-45-38 und cytLambda-56-45-38) die Klonalität überprüft. Liegt eine monoklonale Plasmazellpopulation vor, wird mittels DNA-Analyse die Proliferationsrate (S-Phase) der Plasmazellen ermittelt (= Prognosefaktor).

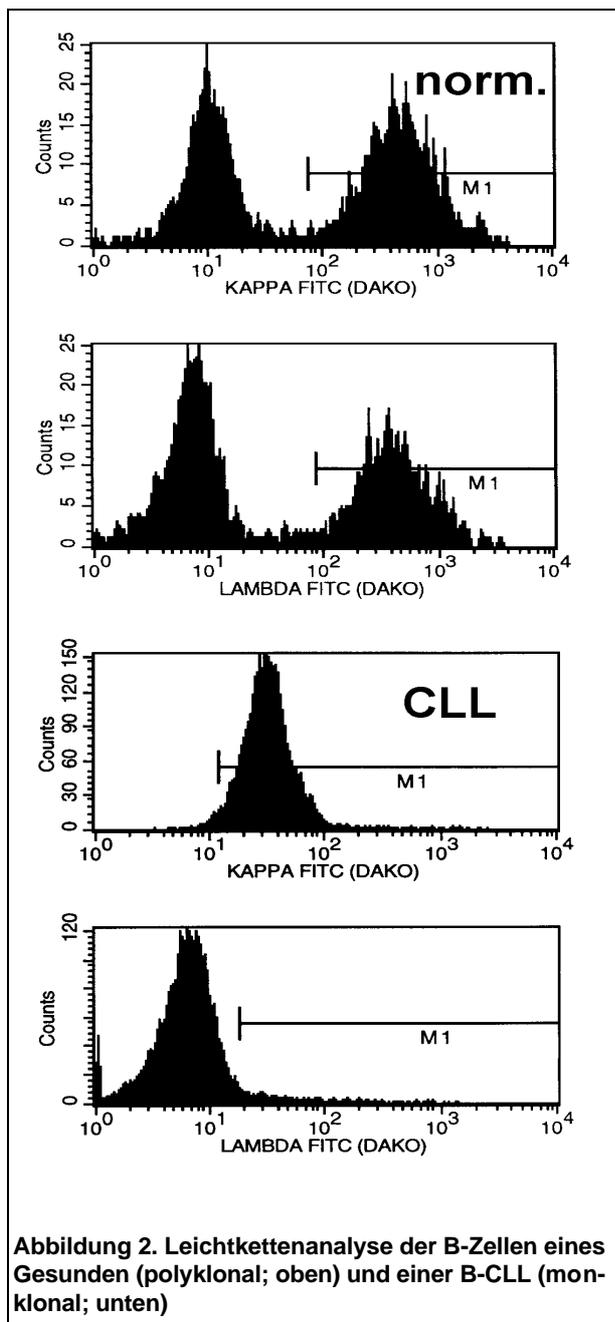


Abbildung 2. Leichtkettenanalyse der B-Zellen eines Gesunden (polyklonal; oben) und einer B-CLL (monoklonal; unten)

III. DER EINFLUSS DER METHODE

Wenn man zwei verschiedene Publikationen über den Immunphänotyp ein und derselben Leukämieform liest, hat man manchmal den Eindruck, die beiden Autoren sprechen von völlig verschiedenen Erkrankungen. Diese manchmal extremen Diskrepanzen haben leicht erklärbare (aber nur sehr schwer zu beseitigende) Ursachen.

Das positiv/negativ Konzept

Durchflußzytometrische Ergebnisse werden auch heute noch überwiegend in folgender Form angegeben: eine mehr oder weniger gut definierte Population der Leukozyten (z.B. alle mononukleären Zellen) oder, schlimmer noch, alle Leukozyten werden als positiv

oder negativ für ein bestimmtes Antigen bezeichnet. Das birgt mehrere Probleme in sich:

- Wann ist eine Population positiv?

a) Wenn man eine Schwelle mit Hilfe der Negativ-Kontrolle setzt, dann betrachten manche Autoren die Population positiv wenn 10% der Zellen über dieser Schwelle liegen. Andere nehmen 20%, andere wiederum 30% als Grenze. Dies trägt nicht zur Vergleichbarkeit der Daten bei.

Empfehlungen der EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias):

Das Limit zur Beurteilung der Positivität eines Markers sollte bei 20% positiver Zellen liegen. Ausnahmen sollten für die hochspezifischen cytoplasmatischen Marker CD79a, CD3 und MPO gemacht werden, bei denen die Grenze bei 10% positiver Zellen liegen sollte [2].

b) Wenn sich eine Population zur Gänze im Vergleich zur Negativkontrolle verschiebt aber nur 15% der Zellen über der Schwelle liegen, ist die Population dann wirklich negativ? Viele verneinen diese Frage. Diese Population ist (schwach) positiv, egal ob nur 9%, nur 29% oder 35% der Zellen über der Schwelle liegen.

Diese Aussage ist natürlich schwer objektivierbar und es liegt dann an der Erfahrung (und der Subjektivität) des Untersuchers, ob er die Population positiv oder negativ sieht. Die nachfolgenden Punkte werden aber zeigen, daß die scheinbar so objektive 30% Grenze letztlich auch keine objektiv vergleichbaren Ergebnisse bringt.

- Methodensensitivität

Ob eine Population positiv oder negativ wird, hängt - gleich welche Kriterien angelegt werden - natürlich auch von der Sensitivität der Methodik ab. Manche Angaben in der Literatur beziehen sich auf immunzytochemische andere auf Immunfluoreszenz- andere wieder auf durchflußzytometrische Methoden. Aber auch wenn man nur die Durchflußzytometrie betrachtet, gibt es mehrere Einflußfaktoren:

a) **Gerätesensitivität:** Geräte verschiedener Firmen aber selbst baugleiche Geräte eines Herstellers können unterschiedliche Empfindlichkeiten aufweisen.

So etwas wirkt sich natürlich nur auf schwach exprimierte Antigene aus. Beispiel CD25: CD25 wurde bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) in den meisten früheren Studien als negativ beschrieben und man definierte damit sogar den Unterschied zur Haarzelleukämie (HZL): CLL galt als CD25 negativ, HZL als CD25 positiv. Diese Aussage ist heute nicht mehr aufrecht zu halten. Eine große Zahl der CLL Fälle wird CD25 positiv, wenn der Antikörper des Klons 2A3 PE-markiert auf einem modernen Durchflußzytometer eingesetzt wird.

b) **Fluoreszenzmarker:** Phycoerythrin (PE) wurde immer als Fluoreszenzmarker für die Markierung schwacher Antigene verwendet, weil damit sensitivere Untersuchungen als mit FITC-markierten Antikörpern möglich sind. Es ist also durchaus zu erwarten, daß Unter-

sucher, die den gleichen Antikörper mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern verwenden, ein und denselben Fall bezüglich seiner Antigenexpression konträr beurteilen. c) Der Antikörper selbst: Auch der Antikörperklon selbst hat Einfluß auf die Stärke der Markierung. Bei konjugierten kommerziellen Antikörpern ist es schwer zu beweisen, daß es am Klon liegt, wenn das Produkt des Herstellers X schwächer markiert als das des Herstellers Y. Es kann dann natürlich auch an der unterschiedlichen Konjugation liegen.

Bleiben wir beim (realen) Beispiel CD25 bei CLL und HZL. Bei Verwendung des PE-Antikörpers der Firma X werden sowohl HZL Zellen als auch CLL Zellen CD25-positiv, auch bei normalen Patienten wird ein großer Teil der B-Zellen CD25-positiv. Bei dem PE-Antikörper der Firma Y hingegen sind nur die HZL Zellen positiv, während die meisten CLL Fälle und praktisch alle normalen B-Lymphozyten negativ reagieren. Es scheint, daß der AK der Firma X einen sensitiveren Nachweis des Antigens ermöglicht.

Verschiedene Klone können aber nicht nur quantitativ anders reagieren, sondern, besonders auf malignen Zellen, auch qualitativ anders (CD15 bei Promyelozytenleukämie [6], CD24 bei Sezarysyndrom-Zellen [7]).

Auch die Immunglobulinsubgruppe kann Einfluß auf das Ergebnis haben: Imamura et al. beschreiben falsch positive Resultate mit murinen IgG2a und IgG3 Antikörpern und empfehlen Antikörper dieser IgG-Subklassen für die Analyse von akuten myeloischen Leukämien nicht zu verwenden[8]. Auch wir bevorzugen im allgemeinen IgG1-Klasse Antikörper.

• Welche Zellpopulation wird überhaupt beschrieben?

Manche Publikationen legen immer noch "Blastenscattergates" über die Zellen und definieren die Antigenexpression dieser Zellgruppe. Dies mag bei hohem Blastenanteil eine homogene Zellgruppe sein, in den anderen Fällen aber nicht. Wenn aber der Anteil der pathologischen Zellen niedrig ist, was bedeutet dann schon CD14 positiv? Heißt es, daß die Blasten CD14 positiv waren oder heißt es, daß im "Blastenscattergate" mehr als 30% Monozyten waren. Ähnlich das Problem bei "GPA-positiven Leukämien". Sind die Blasten GPA-positiv oder sind im Scattergate mehr als 30% rote Vorstufen? Leider geht dies aus den Publikationen und Tabellen oft nicht hervor und es ist dann schwierig, die Ergebnisse einzuordnen, wenn Autoren z.B. unter den M0, M1, M2 und M3 Fällen einen hohen Prozentsatz der Fälle als CD14 positiv publizieren.

• Auch bei korrekter Kompensation können wegen des Meßfehlers falsch positive Zellen vorkommen!

Obwohl es nur sehr selten auftreten wird, sollte man sich des folgenden Problems bewußt sein. Da es nicht leicht zu verstehen ist, möchte ich es an Hand eines Beispiels erklären: Ziel sei es, auf einer bestimmten Zelle, es sei ein Lymphozyt, die CD25 Expression

mittels eines CD25-PE Antikörpers zu messen. Wir markieren die Zelle, messen sie am Zytometer und messen ihre PE-Fluoreszenzintensität (FI). Diese ist 9. Da wir vorher mit der Negativkontrolle die Schwelle der Positivität mit 10 festgelegt haben, gilt unsere Zelle also als negativ.

Markieren wir die Zelle gleichzeitig mit CD25-PE und mit CD45-FITC, wird die Zelle sehr stark grün fluoreszieren, sagen wir, mit einer FI von 2000. Da der FITC-Farbstoff auch in den PE-Kanal hineinstrahlt, sagen wir mit 20%, ist die PE Intensität unserer Zelle jetzt $9 + 2000 \cdot 0.20 = 409$. Das ist aber noch kein Problem, wir wissen ja, daß wir den PE Kanal kompensieren müssen, und zwar mit 20%. Wir ziehen also 20% des FITC-Signals (also 400) vom PE Signal ab und erhalten wieder die korrekte PE Fluoreszenz von 9 ($400 - 9 = 9$). Das alles macht das Durchflußzytometer für uns.

Wir sind aber jetzt von einer Messung ohne Meßfehler ausgegangen und solche Messungen gibt es nicht. Nehmen wir an, der FITC-Photomultiplier oder der nachfolgende Verstärker mißt das FITC Signal um 2% zu niedrig, also statt 2000 nur 1960. Im PE-Kanal wurde hingegen korrekt gemessen, 409 nämlich. Von diesen 409 werden jetzt aber wegen der falsch niedrigen Messung im FITC Kanal nur 392 (=20% von 1960) und nicht 400 abgezogen. Das resultierende PE Signal ist damit 17 und liegt so oberhalb der Schwelle von 10. Die Zelle ist falsch positiv.

Ursache des Fehlers war also eine geringgradig fehlerhafte Messung in einem Kanal, der stark in den Nachbarkanal hineinstrahlt, und zwei sehr unterschiedlich ausgeprägte Antigene. Im Beispiel wurde übrigens vernachlässigt, daß auch das PE Signal in den FITC Kanal hineinstrahlt, was aber bei den gewählten Bedingungen keine Rolle spielt.

Genauere Erklärungen zu diesem Problem kann man im Kapitel "Kompensation" auf der Website von Mario Roederer (<http://www.drmmr.com>) nachlesen.

• Antikoagulans, Probentransport, Probenaufbereitung, pH des Resuspensions-Puffers

Auch diese Faktoren können die Entscheidung über Positivität oder Negativität eines schwach ausgeprägten Antigens beeinflussen (näheres bei Rothe et al.[1]).

Abschließend sei nochmals erwähnt, daß es zwar einfach ist, diese Probleme aufzuzeigen aber sehr schwer, sie einer Lösung auch nur näherzubringen.

IV. AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE

Die sicher noch am häufigsten verwendete Einteilung der akuten myeloischen Leukämien ist die French-American-British (FAB)-Klassifikation [9;10] [11;12]). Daher wird im folgenden auf diese Einteilung Bezug genommen. Durchflußzytometrische Aspekte der WHO Klassifikation [13] werden im Anschluß diskutiert.

Allen obengenannten methodischen Einschränkungen und einer fraglichen Sinnhaftigkeit zum Trotz wird auch eine Übersicht zum Thema Immunphänotyp der FAB-Subtypen dargestellt. Die verwirrend unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Autoren sollen Ihnen aber einen Eindruck über die notwendige Vorsicht bei der Bewertung Immunphänotyps akuter myeloischer Leukämien geben.

AML M0

Definition: Blasten > 30% aller kernhaltigen Knochenmarkszellen; <3% Blasten positiv in der Sudanschwarz- oder Myeloperoxidasefärbung; Fehlen von lymphatischen B- oder T-Zellmarkern außer CD7 und ev. CD2 (nicht unwidersprochen; auch andere lymphoide Antigene bei ansonsten klassischen AMLs M0 beschrieben)); Nachweis der myeloischen Linie durch Expression zumindest eines myeloischen Antigens (CD13 oder CD33). Auch CD11b und MPO können immunologisch, letzteres ev. auch elektronenmikroskopisch, nachweisbar sein [12]. In 82 % der Fälle findet man 2 oder mehr myeloische Antigene auf den Zellen [14]. Auch cytCD33 wird als + beschrieben [15].

Die AML M0 stellt eine Ausnahme der FAB Klassifikation dar, da sie durch Mikroskopie und Zytochemie allein nicht diagnostizierbar ist.

Größere Differenzen ergeben sich bei der Beurteilung der MPO-Positivität (siehe auch Tabelle): während manche Autoren MPO in 100 % der Fälle finden, finden andere diese nur in weniger als 50 % der Fälle. Cohen et al. diskutieren: der FCM-MPO-Nachweis ist methodenabhängig und weder besonders sensitiv für die Diagnose der M0 noch spezifisch für die Diagnose der AML[22]. Andere beschreiben die MPO-Färbung als hochspezifisch und finden sie nur bei myeloischen

	M0	M1	M2	M3
cytMPO	+ [16] + 57 % [14] + 100 % [17] + 1 v.4 F. [18] + 16 % {139}	+ 5 v. 5 F. [18]	+ 6 v. 7 F. [18]	+ 2 v. 2 F. [18]
nTdT	+/- [19] + 44 % [14] + 68 % [17] Kinder +/- [20] + 71 % [21] + 100 % [22]	+ 35 % [17] +/- [19]	+ 9 % [17] -/+ [19]	+ 0 % [17] - [19]
CD2	+ 12 % [17] + 6 % [22]	+ 7 % [17]	+ 15 % [17]	+ 31 % [17] + 28 % [23]
CD3	+ 6 % [22]			
CD4	+ 31 % [17] + 57 % [24]	+ 8 % [17] + 53 % [24]	+ 10 % [17] + 48 % [24]	+ 12 % [17] + 0 % [24]
CD5	+ 10 % [17]	+ 8 % [17]	+ 6 % [17]	+ 13 % [17]
CD7	+ 33 % [14] + 32 % [17] + 42 % [21] + 31 % (25 % dim) [22]	+ 41 % [17]	+ 25 % [17]	+ 7 % [17]
CD10	+ 12 % [17] + 0 % [22]	+ 6 % [17]	+ 7 % [17]	+ 0 % [17]
CD11b	+ 45 % [17]	+ 26 % [17] -/+ [19]	+ 43 % [17] -/+ [19]	+ 13 % [17] - [19]
CD11c	+ 28 % [17] + 100 % [24]	+ 33 % [17] + 93 % [24]	+ 50 % [17] + 95 % [24]	+ 0 % [17] + 14 % [24]
CD13	+/- [19] + [15] + 68 % [17] Kinder: -/dim [20] + 94 % [22] + 86 % [24]	+ 94 % [17] + [19] + 93 % [24]	+ 90 % [17] + [19] + 95 % [25] + 95 % [24]	+ 93 % [17] + [19] + 100 % [24]
CD14	-/+ [19] + 28 % [17] + 12 % [22] - [26] + 0 % [24]	+ 15 % [17] -/+ [19] - [26] + 0 % [24]	+ 36 % [17] -/+ [19] - [26] + 9 % [25] + 14 % [24]	+ 45 % [17] -/+ [19] - [26] + 0 % [24]
CD15	-/+ [19] + 20 % [17] - [26] + 25 % [25] + 57 % [24]	+ 39 % [17] -/+ [19] - [26] + 67 % [24]	+ 81 % [17] + [19] + [26] + 85 % [24]	+ 45 % [17] +/- [19] - [26] + 6 % [25] + 71 % [24]
CD19	+ 8 % [17] + 18 % [22]	+ 9 % [17]	+ 8 % [17]	+ 3 % [17] + 11 % [23]
CD33	+/- [19] + 64 % [17] Kinder: stark+ [20] + 94 % (40 % dim) [22] + 86 % [24]	+ 83 % [17] + [19] + 87 % [24]	+ 95 % [17] + [19] + 50 % [25] + 95 % [24]	+ 100 % [17] + [19] + 100 % [24]

und bei biphenotypischen Leukämien nicht aber bei rein lymphatischen Leukämien [1;2;17;27].

AML M1

Definition: Blasten > 30 % aller kernhaltigen Knochenmarkszellen; Summe der Blasten (Typ I und II) >90 % der nicht-erythroiden Zellen (auch Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen werden ausgeschlossen; [28]); Mindestens 3 % der

Blasten müssen Peroxidase oder Sudanschwarz positiv sein. Die übrigen 10 % der nicht-erythroiden Zellen können reifende Granulozyten und Monozyten sein. D.h. die ausreifende Komponente, ob monozytär oder granulozytär darf nicht über 10 % der nichterythroiden Zellen ausmachen [10].

AML M2

Definition: Blasten > 30 % aller kernhaltigen Knochenmarkszellen; Summe der Blasten (Typ I und II) < 90 % der nicht-erythrozytären Zellen (auch Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen werden ausgeschlossen; [28]); Die ausreifende Komponente (Promyelozyten bis Segmentkernige) muß also > 10 % der nicht-erythrozytären Zellen ausmachen (Abgrenzung gegen M1). Die monozytäre Komponente (Monoblasten+Promonocyten+Monozyten) muß < 20 % ausmachen (Abgrenzung gegen M4) [10] und die Kriterien für M4 dürfen nicht erfüllt sein (siehe dort).

AML M3

Definition[9]:

a) Mehrzahl der Zellen abnormale Promyelozyten mit einem charakteristischem Muster abnormaler Granulation.

b) Zellkern von variabler Größe und Form oft nierenförmig oder zweilappig.

c) Zytoplasma der meisten Zellen ausgefüllt von dicht gepackten oder sogar zusammenlaufenden großen Granula, die in der Romanowsky-Färbung hellrosa, rot oder violett gefärbt sind. In manchen Zellen ist das Zytoplasma mit feinen staubartigen Granula ausgefüllt. Fast immer findet man charakteristische Zellen, die Bündel von Auerstäbchen (faggot = Reisigbündel) enthalten, im Knochenmark oder auch im peripheren Blut. Das Zytoplasma dieser Zellen ist meist klar und blaß-farben, kann aber auch azurophile Granula enthalten.

d) Geplatze Reisigbündelzellen

M3v, "mikrogranuläre" Form: Granula sind lichtmikroskopisch nicht erfaßbar. Zwei oder mehrlappiger oder nierenförmiger Kern.

Wie in der klassischen M3 ist auch bei der M3v die Myeloperoxidase zytochemisch stark positiv und eine Translokation t(15;17) vorhanden. Auch klinisch ähnli-

	M0	M1	M2	M3
CD34	+ [19] + 96 % [17] Kinder +/- [20] + 100 % [22] + 100 % [24]	+ 79 % [17] +/- [19] + 60 % [24]	+ 71 % [17] -/+ [19] + 52 % [24]	+ 14 % [17] - [19] + 29 % [24] + 23 % [23]
CD36	+ 53 % [24]	+ 57 % [24]	+ 52 % [24]	+ 17 % [24]
CD41	- [19] 0 % [14] + 0 % [22]	- [19]	- [19]	- [19]
CD56	+ 57 % [24]	+ 13 % [24]	+ 43 % [24]	+ 0 % [24]
CD61	- + 0 % [14] + 0 % [22] + 29 % [24]	+ 20 % [24]	+ 20 % [24]	+ 0 % [24]
CDw65	+/- [26]	+ [26]	+ [26]	+/- [26]
cyt CD68	+ 33 % [14]			
CD117 (c-kit)	+ 58 % [17] + 80 % [29] + 57 % [24]	+ 75 % [17] + 100 % [29] + 67 % [24]	+ 65 % [17] + 75 % [29] + 71 % [24]	+ 14 % [17] + 70 % [29] + 29 % [24]
CD13 oder CD33	+ 88 % [14] + 84 % [17] + 100 % [22]	+ 98 % [17]	+ 100 % [17]	+ 100 % [17]
CD13 und CD33	+ 48 % [17]	+ 80 % [17]	+ 85 % [17]	+ 93 % [17]
CD33-/CD13+	+ 20 % [17]	+ 15 % [17]	+ 5 % [17]	+ 0 % [17]
CD33+/CD13-	+ 16 % [17]	+ 16 % [17]	+ 10 % [17]	+ 7 % [17]
Gly-A	- [19] + 0 % [14] + 0 % [24]	- [19] + 13 % [24]	- [19] + 5 % [24]	- [19] + 0 % [24]
HLA-DR	+ + 88 % [17] + 57 % [24]	+ 87 % [17] + [19] + 80 % [24]	+ 91 % [17] + [19] + 86 % [24]	+ 7 % [17] - [19] + 6 % [25] + 29 % [24]

Angaben in "+ X%" verstehen sich als positiv in X% der untersuchten Fälle. "+ X v. X F." = positiv in X von X untersuchten Fällen. "+" wird von den Autoren i.A. als meistens positiv, "+/-" als überwiegend positiv, "-/+" überwiegend negativ und "-" als meistens negativ definiert.

ches Verhalten (Gerinnungsstörungen - Verbrauchs-koagulopathie aber meist normales ATIII).

Piedras et al. unterteilen die M3 in "hyper- und hypogranuläre", je nachdem wie hoch das Side-Scatter-Signal der Zellen ist. Diese Einteilung war nicht kongruent mit der Einteilung in M3 und M3v, d.h. in beiden Gruppen (M3 und M3v) gab es hyper- und hypogranuläre Formen. Die hypogranulären Formen schienen unreifer, höherer Anteil von CD34 und HLA-DR-positiven Fällen. Leider waren nicht alle Fälle der Studie zytogenetisch abgesichert [30].

Erber fanden eine Koexpression von CD9 und CD68 bei gleichzeitiger Absenz von HLADR typisch für M3 [31]. Andere Autoren konnten dies nicht nachvollziehen [30].

CD2 ist bei M3 relativ häufig koexprimiert. Dies soll mit dem Typ M3v korrelieren [32]: die Autoren fanden CD2 bei keinem von 24 M3 Fällen aber bei 16 von 19 M3v Fällen. Sie fanden aber keine Korrelation der CD2 Expression mit einer bestimmten molekularbiologischen Variante der M3. Eine italienische Gruppe

bestätigte den Zusammenhang der CD2-Expression mit der M3v fand aber auch eine Korrelation der CD2 Expression mit der bcr3 Isoform der M3 [23].

Dieselbe Gruppe charakterisierte den Immunphänotyp der M3 wie folgt: häufige Expression von CD13, CD33 und CD9, seltene Expression von CD10, CD7 und CD11b. CD2 positiv in 28%, CD34 in 23% und CD19 in 11% der Fälle. CD2 und CD34 korrelierten mit der bc3 Isoform und mit M3v, CD19 Expression korrelierte mit der Leukozytenzahl [23].

Menell et al. fanden eine erhöhte Expression von Annexin II auf M3 Zellen [33]. Die Unterschiede zu der Annexinexpression der anderen akuten myeloischen Leukämien erscheinen aber zu gering, um dies diagnostisch auszunutzen.

Edwards et al. fanden bei M3 in 7 von 17 Fällen einen signifikanten Anteil von CD34-positiven Zellen, die auch die Translokation t(15;17) aufwiesen. M3-Zellen können demnach teilweise oder größtenteils CD34 positiv sein[34].

Exner et al. beschreiben 4 von 4 M3v als CD34pos, 3 von 4 als CD2 positiv, 2 von 3 als CD117 positiv, 2 von 4 als HLA-DR positiv, während bei den 8 M3-Fällen der typische Phänotyp CD34 negativ, HLA-DR negativ, CD2 negativ, gefunden wurde (CD117 wurde bei den M3-Fällen nicht getestet)[35]. Alle M3 und M3v-Fälle dieser Serie waren CD15 negativ (gemessen mit Clone VIM-C6).

AML M4

Die exakte FAB Klassifikation der M4 ist sehr komplex. Sie wird oft nur verkürzt als AML mit monozytärem Anteil von 21-80 % wiedergegeben.

Definition: Blasten ≥ 30 % aller kernhaltigen Knochenmarkszellen und daher auch ≥ 30 % aller nicht-erythroiden Zellen; Die granulozytische Komponente (Myeloblast bis Segmentkerniger) muß ≥ 20 % der nicht-erythrozytären Zellen ausmachen (Abgrenzung gegen M5).

Die AML ist keine M2, wenn der Nachweis einer signifikanten monozytären Komponente durch Erfüllung einer der folgenden Bedingungen (a -c) erfüllt ist:

a) [Monozytäre Komponente (Monoblast bis Monozyt) im Knochenmark ≥ 20 % der nicht-erythroiden Zellen] UND [> 5000 Monozyten/ μ l im peripheren Blut].

b) [Monozytäre Komponente (Monoblast bis Monozyt) im Knochenmark ≥ 20 % der nicht-erythroiden Zellen] UND [zytochemische Bestätigung der monozytären Komponente ODER Nachweis erhöhter Lysozymkonzentration].

c) Wenn das Knochenmark einer M2 entspricht (monozytäre Komponente kleiner 20 % der nicht-erythrozytären Zellen) kann die AML trotzdem als M4 klassifiziert werden wenn: [> 5000 Monozyten/ μ l im peripheren Blut] UND [zytochemische Bestätigung der monozytären Komponente ODER Nachweis erhöhter Lysozymkonzentration].

Definitionen: Zytochemische Bestätigung der monozytären Komponente = > 20 % der Vorläuferzellen sind zytochemisch Monozyten.

Erhöhte Lysozymkonzentration = mehr als dreifache Erhöhung im Vergleich zum Normalwert in Urin oder Serum

AML M4Eo: FAB-Definition: Anteil Eosinophiler meist ≥ 5 der nicht erythrozytären Zellen des Knochenmarks. Diese zeigen neben der normalen Granula auch große basophile Granula und können auch unsegmentierte Kerne aufweisen. Die M4Eo Eosinophilen sind im Gegensatz zu normalen Eosinophilen Chloracetatesterase- und PAS-positiv.

Klinisch; hohe Leukozytenzahl, Hepatosplenomegalie, hohe Inzidenz von ZNS Leukämie.

Bei M4Eo mit inv(16)(p13;q22) fanden Adriansen et al. in allen Fällen eine CD13 Expression aller leukämischen Zellen und eine teilweise Positivität für CD2, CD58, CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD34, CD36, CDw65, TdT und HLADR. Das CD2 Antigen war sowohl auf unreiferen (CD34+CD14-) Zellen als auch auf reiferen monozytischen (CD34-CD14+) Zellen, während die TdT Expression auf die unreifen Zellen beschränkt war [36].

Dunphy findet CD2 Expression nur bei M4Eo mit inv(16)[37].

Durchflußzytometrisch kann die M4 ähnliche Probleme wie die M5 bringen (siehe dort).

AML M5

Definition: Blasten ≥ 30 % aller kernhaltigen Knochenmarkszellen und daher auch ≥ 30 % aller nicht-erythroiden Zellen; Die monozytäre Komponente (Monoblast bis Monozyt) muß > 80 % der nicht-erythroiden Zellen des Knochenmarks ausmachen.

M5a: Monoblasten ≥ 80 % der monozytären Komponente im Knochenmark.

M5b: Monoblasten < 80 % der monozytären Komponente im Knochenmark.

Überraschenderweise kann die Durchflußzytometrie für die Erkennung der M5 keine verlässliche Hilfestellung bieten. Die monozytäre Komponente der Leukämie kann CD14 positiv sein, sie ist aber in einem großen Teil der Fälle CD14 negativ (siehe Tabellen). CD64 soll in Kombination mit CD14 die Sensitivität der Monozytendetektion erheblich verbessern [38], es liegen hierzu aber noch nicht viele Daten vor.

AML M6

FAB-Definition: Erythroblasten (Anm.: Damit müssen Proerythroblasten bis Normoblasten gemeint sein, auch wenn es in der Originalarbeit nicht exakt definiert ist) machen mehr als 50 % der kernhaltigen Knochenmarkszellen aus; Blasten ≥ 30 % der nicht-erythroiden Zellen [10].

Die Einteilung der M6 ist nicht unumstritten, da die sog. pure erythroid malignancies, z.B. die DiGuglielmo-Erkrankung von der FAB Klassifikation für Akute

	M4	M4eo	M5	M5a	M5b
cytMPO	+ 2 v. 3 F. [18]		- [42]	+ 2 v. 5 F. [18]	
nTdT	+ 22 % [17] -/+ [19]		+ 22 % [17] -/+ [19]		
CD2	+ 20 % [17]		+ 22 % [17]		
CD3					
CD4	+ 30 % [17] + 64 % [24]	+ 20 % [24]	+ 37 % [17]	+ 0 v. 3 F. [24]	+ 83 % [24]
CD5	+ 6 % [17]		+ 14 % [17]		
CD7	+ 25 % [17]		+ 48 % [17]		
CD10	+ 6 % [17]		+ 12 % [17]		
CD11b	+ 73 % [17] + [19]		+ 82 % [17] + [19]	+ 80 % [45]	
CD11c	+ 59 % [17] + 100 % [24]	+ 60 % [24]	+ 72 % [17]	+ 3 v. 3 F. [24]	+ 100 % [24]
CD13	+ 94 % [17] + [19] + 100 % [24]	+ 100 % [24]	+ 96 % [17] +/- [19]	+ 2 v. 3 F. [24]	+ 100 % [24]
CD14	+ 90 % [17] + [19] + [26] + 53 % [25] + 18 % [24]	+ 20 % [24]	+ 86 % [17] + [19] +/- [26]	+ 28 % [25] + 30 % [45] + 0 v. 3 F. [24]	+ 74 % [25] + 67 % [24]
CD15	+ 76 % [17] + [19] + [26] + 54 % [25] + 64 % [24]	+ 100 % [24]	+ 72 % [17] +/- [19] +/- [26]	+ 3 v. 3 F. [24]	+ 44 % [25] + 100 % [24]
CD19	+ 6 % [17]		+ 6 % [17]		
CD33	+ 100 % [17] + [19] + 100 % [24]	+ 100 % [24]	+ 98 % [17] +/- [19]	+ 3 v. 3 F. [24]	+ 100 % [24]
CD34	+ 71 % [17] -/+ [19] + 45 % [24]	+ 60 % [24]	+ 47 % [17] +/- [19]	+ 0 v. 3 F. [24]	+ 17 % [24]
CD36	+ 91 % [24]	+ 20 % [24]		+ 3 v. 3 F. [24]	+ 100 % [24]
CD41	- [19]		- [19]		
CD56	+ 18 % [24]	+ 0 % [24]		+ 2 v. 3 F. [24]	+ 67 % [24]
CD61	+ 10 % [24]	+ 0 % [24]		+ 0 v. 3 F. [24]	+ 50 % [24]
CDw65	+ [26]		+ [26]		
cyt CD68					
CD117 (c-kit)	+ 64 % [17] + 82 % [24]	+ 80 % [24]	+ 33 % [17]	+ 100 % [29] + 3 v. 3 F. [24]	+ 9 % [29] + 0 % [24]
CD13 oder CD33	+ 100 % [17]		+ 100 % [17]		
CD13 und CD33	+ 94 % [17]		+ 94 % [17]		
CD33-/CD13+	+ 0 % [17]		+ 2 % [17]		
CD33+/CD13-	+ 6 % [17]		+ 4 % [17]		
Gly-A	- [19] + 9 % [24]	+ 0 % [24]	- [19]	+ 0 v. 3 F. [24]	+ 0 % [24]
HLA-DR	+ 94 % [17] + [19] + 100 % [24]	+ 100 % [24]	+ 96 % [17] + [19]	+ 3 v. 3 F. [24]	+ 100 % [24]

Leukämien ausgeschlossen sind, aber nicht in die MDS-Kategorie passen [39].

Manche Autoren schlagen eine Unterteilung in M6a und M6b vor [43].

Die Insuffizienz der FAB-Klassifikation bei Erythro-leukämien hat zu einer gewissen Konfusion in der Literatur geführt. Folgende Gruppen sind in der Lite-ratur definiert worden:

1.) M6a entspricht dabei weitgehend der klassischen FAB-Definition für M6 ($\geq 30\%$ Myeloblastenanteil unter den nicht-erythroiden Zellen). Entspricht den früher als Erythro-leukämie oder DiGuglielmo *Syn-drom* bezeichneten Bildern [19].

2.) M6b zeichnet sich durch einen hohen Pro-erythroblastenanteil aus, der definitionsgemäß $\geq 30\%$ der kernhaltigen *erythroiden* Population betragen muß.

	M6	M6v [40]	M7
cytMPO	+ nur in Myeloblasten [41]	+ 0 %	- [42] - [15]
nTdT	- [19]		- [19] - [15]
CD2		+ 0 %	
CD3			
CD4	+ 0 v. 2 F. [24]		+ 1 v. 1 F. [24]
CD5			
CD7		+ 38 %	
CD10			
CD11b	-/+ [19]		- [19]
CD11c	+ 2 v. 2 F. [24]		+ 1 v. 1 F. [24]
CD13	+/- [19] + 2 v. 2 F. [24]	+ 0 %	-/+ [19] + 1 v. 1 F. [24]
CD14	-/+ [19] - [26] + 0 v. 2 F. [24]	+ 0 %	- [19] - [26] + 0 v. 1 F. [24]
CD15	- [19] +/- [26] + 2 v. 2 F. [24]		- [19] - [26] - [15] + 0 v. 1 F. [24]
CD19		+ 0 %	
CD33	+/- [19] + 2 v. 2 F. [24]	+ 38 %	-/+ [19] + 1 v. 1 F. [24]
CD34	-/+ [19]	+ 25 %	+/- [19]
CD36	+ 0 v. 2 F. [24]	+ 86 % (stärker als auf Mo.)	+ 1 v. 1 F. [24]
CD41	- [19]	+ 13 % d.F.	+ [19]
CD56	+ 0 v. 2 F. [24]		+ 0 v. 1 F. [24]
CD61	+ 0 v. 2 F. [24]		+ 1 v. 1 F. [24]
CDw65	+/- [26]		+/- [26] - [15]
cyt CD68			
CD117 (c-kit)	+ 2 v. 2 F. [24]		+ 100 % [29] + 1 v. 1 F. [24])
Gly-A	+ [19] + 37 % [25] + 0 v. 2 F. [24]	+ 38 % d.F.	- [19] + 0 v. 1 F. [24]
HLA-DR	+/- [19] + 2 v. 2 F. [24]	+ 0 % d.F.	+/- [19] + 1 v. 1 F. [24]

Entspricht den früher als *Reine* Erythroleukämie oder DiGuglielmo *Erkrankung* bezeichneten Bildern. Nur wenige Myeloblasten, keine Auerstäbchen, MPO zytochemisch negativ.

Ausschluß von reaktiven (z.B.: Vit B12/Folatmangel, hämolyt. Anämie) oder angeborenen Erkrankungen (angeborene dyserythropoetische Anämien -CDA) notwendig.

3) Zu Studienzwecken definierte Mazzella eine Gruppe M6c, bei der beide Bedingungen erfüllt sind (Proerythroblasten $\geq 30\%$ der kernhaltigen *erythroiden* Population und Myeloblasten $\geq 30\%$ der nicht-erythrozytären Zellen).

4) Auch eine Gruppe von lichtmikroskopisch und zytochemisch undifferenzierten aber immunologisch oder ultrastrukturell erythroid differenzierten AMLs sollte zur M6 gerechnet werden [44]. Garand et al. beschrei-

ben eine minimal differenzierte akute Erythroleukämie die durch morphologisch undifferenzierte oder proerythroblastenähnliche Blasten mit dem Phänotyp HLA-DR negativ, CD36 stark positiv, B-Marker negativ, T-Marker negativ (außer ev. CD7), myeloische Marker negativ (außer ev. CD33), meist CD34 negativ, gekennzeichnet ist. Glykophorin A war nur in 38 % der Fälle positiv [40]. Die Autoren schlagen für diese Art der Leukämie die Bezeichnung M6variant vor.

Flandrin schlägt die Bezeichnung M6variant für die unter Punkt 2 und 4 definierten Gruppen vor [15].

Da die meisten Untersucher des Immunphänotyps der AML keine derartig differenzierte Betrachtung der M6 vorgenommen haben, muß man mit großer Heterogenität in dieser Gruppe rechnen. Diese Heterogenität überträgt sich natürlich auch auf die durchflußzytometrischen Ergebnisse. Dazu kommt, daß, besonders bei unkritischer Analyse der mononukleären Fraktion nach Ficoll-Separation, nicht immer klar wird, welche Population analysiert wurde.

Orfao fand GP-A nur in 37 % der FAB M6 Fälle positiv. Das könnte durch das Fehlen von GP-A auf den frühen erythroiden Vorstufen bedingt sein. Er empfiehlt den Einsatz zusätzlicher Marker wie CD36 und Carboanhydrase [25].

AML M7

Definition: Blasten $\geq 30\%$ aller kernhaltigen Knochenmarkszellen. Nachweis von Megakaryoblasten mittels immunologischer Marker oder Elektronenmikroskopie.

SPEZIELLES ZU EINZELNEN MARKERN

- **MPO (immunologisch):** Verlässlicher Marker für myeloische Differenzierung [16].

Ausprägung im Zytoplasma. Zytoplasmatische Färbung notwendig. Im normalen Knochenmark findet man MPO bereits in CD34-positiven Zellen, in Promyelozyten und in den reiferen Formen der Granulopoese. Monozyten zeigen schwächere MPO-Positivität [6]. Durch Kombination der MPO-Färbung mit intrazellulärer Färbung von Lactoferrin, welches in Myeloblasten und Promyelozyten fehlt und erst ab dem Myelozyten exprimiert wird, kann man eine unreife, MPO-positive, Lactoferrin-negative Zellpopulation definieren [6].

Nguyen et al. fanden die Blasten bei 3 von 4 M0 Fällen MPO negativ, bei 2 von 5 M5a Fällen positiv [18].

Andere Autoren fanden MPO negativ bei M5 und M7 [42] [16] [46] [15].

Bei in-situ-Hybridisierungsuntersuchungen fanden Traweek et al. in 3 von 6 M0, 1 von 3 M5a und 1 von 1 M7 keine MPO mRNA in den Blasten [47].

- **nTdT**: Zytoplasmatische Färbetechnik notwendig, um Kern zu erreichen.

Häufiger auf den Blasten der M0, M1 und M5 [19].

Parreira BJH 1988: M0 und M1 häufiger TdT positiv als M2-M5. M6 und M7 sind typischerweise TdT negativ.

Orfao et al.: TdT wurde in 11 % der AML Fälle gefunden (n=224) [25].

TdT wurde ursprünglich als lymphatische Marker angesehen, später jedoch auch bei AML gefunden. Es konnte aber gezeigt werden, daß TdT am stärksten bei B-ALL, schwächer bei T-ALL und noch schwächer bei AML ausgeprägt ist, wenn man die Fluoreszenzintensitäten der Populationen vergleicht [48].

- **CD3**: Verlässlicher Marker für die T-Zellreihe [49]. Ausprägung im Zytoplasma geht der Membranexpression voran [50]. Zytoplasmatische Färbung erfaßt daher auch unreifere Formen.

- **CD7**: Expression bei 10 bis 30 % aller AML Fälle. Häufiger bei M0, M1 und M5a und oft assoziiert mit "Unreife-Markern" wie CD34, TdT und HLA-DR [19]. Biologische und prognostische Bedeutung wird nicht einheitlich beurteilt.

- **CD13**: Marker für myeloische Differenzierung. Ausprägung im Zytoplasma geht der Membranexpression voran [51]. Zytoplasmatische Färbung erfaßt auch unreifere Formen.

- **CD15**: In der Mehrzahl der M2, M4 und M5 Fälle positiv; in der Hälfte der M1 und M3 Fälle; selten positiv in M0 Fällen [19]. Sperling et al. [52] beschreiben M3 als typischerweise CD15 negativ (in 80 % der Fälle).

Ein Problem mit CD15 liegt in der unterschiedlichen Reaktivität verschiedener Klons [6]. CD15 Positivität in AML wird daher sehr unterschiedlich beschrieben (je nach Studie und Antikörperklon 31 bis 76 % der Fälle). Auch die aberrante Nichtexpression von CD15 bei M3 (CD15 sollte auf normalen Promyelozyten vorhanden sein), die mit dem Klon VIMD5 beschrieben

wurde, [54] scheint nicht mit allen Klons reproduzierbar zu sein.

- **CD22**: Verlässlicher Marker für die B-Zellreihe [49].

Ausprägung im Zytoplasma geht der Membranexpression voran [50]. Zytoplasmatische Färbung erfaßt auch unreifere Formen.

Antigenexpression bei AML im Kindesalter Tabelle 1 (Creutzig et al. [53])

Subtype (N)	HLA-DR	CD34	CD13	CD33	CDw65
M0 (15)	7 (54 %)	7 (64 %)	6 (46 %)	8 (62 %)	7 (58 %)
M1 (10)	5 (63 %)	6 (75 %)	6 (60 %)	9 (90 %)	6 (60 %)
M1 Auer (14)	12 (100 %)	10 (91 %)	10 (83 %)	10 (83 %)	9 (75 %)
M2 (21)	8 (38 %)	5 (31 %)	14 (67 %)	20 (95 %)	17 (89 %)
M2 Auer (51)	48 (96 %)	30 (64 %)	41 (82 %)	47 (94 %)	40 (82 %)
M3 (14)	0 (0 %)	1 (8 %)	11 (79 %)	14 (100 %)	10 (77 %)
M4 (26)	22 (92 %)	7 (32 %)	18 (75 %)	22 (92 %)	19 (86 %)
M4Eo (35)	31 (89 %)	21 (68 %)	32 (94 %)	31 (89 %)	31 (91 %)
M5 (58)	54 (98 %)	10 (21 %)	13 (25 %)	49 (91 %)	50 (98 %)
M6 (7)	5 (83 %)	1 (20 %)	4 (80 %)	4 (67 %)	4 (67 %)
M7 (15)	9 (69 %)	5 (33 %)	4 (31 %)	8 (62 %)	3 (23 %)
Positive Fälle	201 (80 %)	103 (45 %)	159 (64 %)	222 (88 %)	196 (81 %)
Fälle	251	229	248	252	242

- **CD41**: Gilt gemeinsam mit CD61 als der verlässlichste Marker für megakaryoblastäre Differenzierung (M7). Bei Reaktion der Blasten mit anti-CD41 ist es ratsam, die Zellen in EDTA-Puffer zu inkubieren und zu waschen, um angelagerte Thrombozyten/fragmente zu entfernen, und den Ansatz danach zu wiederholen.

- **CD61**: Gilt gemeinsam mit CD41 als der verlässlichste Marker für megakaryoblastäre Differenzierung (M7). Bezüglich Artefakte siehe CD41. Eine Arbeit beschreibt intrazelluläre CD61 Expression bei fehlender Oberflächenexpression [55].

- **CD64**: Soll in Kombination mit CD14 die Sensitivität der Monozytendetektion erheblich verbessern, da letzteres bei M4/M5 oft nicht exprimiert wird. Auch bei M3 positiv, aber schwächer exprimiert [38].

• **CD66c**: Immunhistochemische Studie: CD66c ist im normalen Knochenmark nur auf myeloiden Zellen exprimiert, wobei Promyelozyten die höchste Expression zeigen. Es fand sich bei 24 % aller AML M4 Fälle und selten auch in anderen FAB Gruppen. Bei akuter Promyelozytenleukämie fehlte CD66c in 9 von 19 Fällen, die Expression konnte aber in-vitro durch all-trans Retinoinsäure erzeugt werden [56].

Antigenexpression bei AML im Kindesalter Tabelle 2 [53]					
Subtype (N)	CD14	CD15	GlyA	CD41	TdT (IFLU)
MO (15)	0 (0 %)	4 (33 %)	2 (20 %)	0 (0 %)	5 (42 %)
M1 (10)	0 (0 %)	1 (14 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (40 %)
M1 Auer (14)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (10 %)	0 (0 %)	6 (55 %)
M2 (21)	6 (32 %)	10 (59 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (11 %)
M2 Auer (51)	5 (10 %)	26 (53 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	15 (32 %)
M3 (14)	0 (0 %)	3 (23 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (15 %)
M4 (26)	6 (27 %)	14 (64 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (17 %)
M4Eo (35)	24 (71 %)	20 (59 %)	0 (0 %)	1 (3 %)	6 (18 %)
M5 (58)	22 (42 %)	36 (75 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (4 %)
M6 (7)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (20 %)	1 (25 %)	2 (29 %)
M7 (15)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	5 (45 %)	3 (20 %)
Positive	63 (27 %)	114 (50 %)	4 (2 %)	7 (3 %)	51 (21 %)
Fälle	234	226	215	208	247

- **CD68:** Knapp et al.: Der Versuch, cytCD68 als Marker für myeloische Differenzierung einzusetzen, ergab, daß auch bei ca. 50 % der untersuchten ALL-Blasten Reaktivität mit anti-CD68 nachweisbar war. Alle diese ALLs waren CD19+, cytCD22+, MPO- B-ALL [6].

- **CD117 (c-kit):** Muroi et al.: CD117 positiv in 28 von 35 Fällen von de novo AML. Negativ in 9 von 9 Fällen von B-ALL. In 7 der B-ALL Fälle war eines der Antigene CD13, CD15 oder CD33 positiv [57].

Cascavilla et al.: Positiv (definiert als >10 % der Zellen) in 74 % aller AML-Fälle, 100 % aller M1 und M7, 80 % aller M0, 75 % aller M2 und 70 % aller M3 Fälle. Negativ in allen ALL Fällen. Conclusio: CD117 spezifische Marker für myeloische Differenzierung und Indikator für Reifegrad der myeloischen Zellen [29].

Wells et al.: CD117 ist bei den Blasten der meisten AMLs nachweisbar (87 % der Fälle), korreliert nicht mit einem bestimmten FAB-Subtyp und findet sich auch auf myeloischen Blasten, die auch lymphatische Antigene koexprimieren (CD4, CD7 oder CD2) [58].

Valverde et al.: fanden CD117 in 50 % aller unter-

suchten AML positiv, ohne Korrelation mit den FAB Subtypen. Unter den als M0 klassifizierten Leukämien waren 7 von 10 positiv. Nur in einem Fall von 23 ALLs, einer CD13-positiven T-ALL, war CD117 positiv. Die Autoren halten CD117 für einen sinnvollen und spezifischen Marker für myeloide Differenzierung.

M5: nur auf 9 % aller M5b Fälle, aber auf 100 % aller M5a-Fälle. Entsprechend inverse Korrelation zur Expression von CD4, CD14, CD15[59].

• **Adhäsionsmoleküle:** Vila et al.: Serie: 67 Fälle vom AML. CD49b, CD49d, CD49e wurden auf 20, 54 bzw. 61 % aller AML-Fälle exprimiert. Es konnte keine Korrelation zur FAB-Klassifikation gefunden werden [60].
Reuss-Borst et al.: CD44, LFA-3, VLA-4, VLA-5 und LFA-1 fanden sich auf mehr als 70 % der Blasten der meisten Leukämiefälle. CD11b/CD18 und CD11c/CD18 fanden sich vorwiegend in der FAB M4 und M5 Gruppe. VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-6 und E-Selectin waren auf mehr als 70 % der

Blasten eines Teils der Leukämien (mit ansonsten variablem Phänotyp) nachweisbar [61].

Archimbaud et al.: Serie: 50 Fälle von ANLL: CD58 fand sich durchschnittlich auf 45±26 % aller Leukämiezellen, CD54 auf 17±15 % [62].

De Waele et al.: Serie: 10 AML, 8 B-Linien-ALLs, 6 normale Knochenmarke. CD34+ Zellen in AML und ALL hatten eine geringere Expression von VLA-2 und VLA-3 und eine höhere Expression von ICAM-1 und LFA-3 als CD34+ Zellen des normalen Knochenmarks. AML CD34+ Zellen zeigten weniger L-Selectin aber mehr VLA-5 als normale myeloide CD34+ Zellen [63].

EXPRESSION MYELOIDER ANTIGENE BEI AML

Sperling et al.: 97 % aller AMLs exprimieren wenigstens eines der myeloiden Oberflächenantigene CD13, CD33 und CDw65. 13 % der Fälle exprimieren nur eines dieser drei. Der Einsatz von mindestens 3 myeloischen Markern wird daher empfohlen [52]. 97 % aller AMLs exprimieren entweder CD13 oder CD33 [25]. CD33 und CD13 in 95 bzw. 94 % aller AML-Fälle nachweisbar [24].

EXPRESSION LYMPHOIDER ANTIGENE BEI AML

In 24 % der Fälle lymphatische Antigene nachweisbar, meist T-Zellmarker, nur in 3 % der Fälle war CD19 nachweisbar. CD10 war in dieser Serie (n=239) nicht

AML FAB-TYPEN HÄUFIGKEITSVERTEILUNG (IN % DER FÄLLE)								
Referenz	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
[52] (n=218)		18.8	27.5	5.5	27.1	16.1	4.6	0.5
[17] (n=272)	9	19.8	11.8	10.6	18.8	18.8		
[28]		15-20	30	5-10	15-20	15	3-4	2-4
Div.	2-3[45]							8 [25]

Antigenexpr./AML im Kindesalter Tabelle 3 [53]				
Subtype (N)	CD2	CD4	CD7	CD19
MO (15)	3 (25 %)	4 (31 %)	4 (31 %)	0 (0 %)
M1 (10)	1 (14 %)	1 (14 %)	5 (56 %)	1 (13 %)
M1 Auer (14)	2 (20 %)	2 (17 %)	7 (58 %)	0 (0 %)
M2 (21)	0 (0 %)	6 (38 %)	2 (10 %)	0 (0 %)
M2 Auer (51)	2 (4 %)	4 (9 %)	7 (14 %)	1 (2 %)
M3 (14)	3 (30 %)	2 (18 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
M4 (26)	2 (19 %)	13 (57 %)	2 (8 %)	0 (0 %)
M4Eo (35)	7 (23 %)	15 (48 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
M5 (58)	3 (7 %)	29 (66 %)	3 (6 %)	3 (6 %)
M6 (7)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
M7 (15)	0 (0 %)	1 (14 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Positive	23 (11 %)	77 (36 %)	30 (12 %)	5 (2 %)
Fälle	211	214	245	237

nachweisbar [52].

Serien von 46-168 Patienten: CD7 in 21 %, CD2 in 11 %, CD10 in 9 % und CD19 in 8 % der Fälle. Die heute nicht mehr als typisch lymphatisch angesehenen Antigene CD4 und TdT wurde in 57 bzw. 11 % der Fälle gefunden (n=136 bzw. 224). Keine präferenzielle Assoziation der lymphatischen Koexpression mit unreifen AML Formen [25].

Drach et al.: Serie von 68 Patienten: CD7 in 22 %, CD5 in 5 %, CD2 in 1.9 % [64].

Lauder et al.: Serie von 74 AML: 22 % exprimierten lymphatische Antigene: CD7 in 9 %, CD2 in 8 %, CD5 in 5 %, CD19 in 3 % und CD20 in 1 % der Fälle [65].

Khalidi et al.: In 48 % der Fälle lymphoide Antigene nachweisbar. CD20 in 17 %, CD7 in 16 %, CD19 in 10 %, CD2 in 8 %, CD3 in 7 %, CD5 in 5 % und CD10 in 3 %. CD2 häufiger bei M3, CD20 häufiger bei M5 [24].

Es muß angenommen werden, daß ein Teil der publizierten "abnormalen" Expressionen auch durch methodische Artefakte bedingt ist. Im Vergleich zur Negativkontrolle stärkere unspezifische Bindungen eines Antikörpers können vorkommen, auch das Binden des Fluorochroms an die Leukämiezellen ist beobachtet worden. Eine gewisse Skepsis bei Fallstudien ist daher sicher nicht unangebracht.

CD7+/CD56+ AKUTE MYELOIDE/NATURAL KILLER ZELL LEUKÄMIE

Verschiedene Autoren postulierten in den letzten Jahren eine neue Krankheitsentität, die sog. Myeloide/Natural Killer Zell (Vorläufer-) Leukämie [66-69]. Der charakteristische Phänotyp sei CD7+, CD56+ und CD33+. Die morphologischen und immunphänotypi-

schen Charakteristika der einzelnen publizierten Fälle sind von Autor zu Autor aber auch innerhalb ein und derselben Studie einigermaßen unterschiedlich. Manche der vorgestellten Fälle würden auch als myeloische Leukämie mit Koexpression lymphatischer Antigene einteilbar sein. Die Bedeutung dieser Entität erscheint nicht endgültig geklärt.

WHO KLASSIFIKATION DER AKUTEN MYELOISCHEN LEUKÄMIEN [13]

1. AMLs mit regelhaften zytogenetischen Translokationen

AML mit t(8;21)

Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)

AML mit abnormen Knochenmarksesinophilen mit inv(16)

AML mit 11q23 Irregularitäten

2. AML mit multilineärer Dysplasie

mit vorausgehendem MDS

ohne vorausgehendes MDS

3. AML und therapiebedingte myelodysplastische Syndrome

Alkylantien-bedingt

Epipodophyllotoxin-bedingt

andere Typen

4. AML nicht anderwertig klassifiziert

AML minimal differenziert

AML mit Reifung

Akute Myelomonozytäre Leukämie

Akute Monozytäre Leukämie

Akute Erythroleukämie

Akute Megakaryozytäre Leukämie

Akute Basophilenleukämie

Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Daneben gibt es die Gruppe der Akuten biphanotypischen Leukämien.

Allgemeines:

a) Die "30 % Grenze" für die Definition der akuten Leukämien wurde verlassen. Ein Blastenanteil von 20 % und mehr soll die akute Leukämie definieren. Ehemalige RAEB-IT Fälle zählen dann bereits zur akuten Leukämie. Die Entität RAEB-IT wurde aufgelassen.

b) Man hat 4 zytogenetisch definierte AML-Gruppen aus der FAB-Klassifikation "herausgenommen" und als eigene Entitäten definiert.

c) Da AMLs mit multilineärer Dysplasie und posttherapeutische AMLs bestimmte, regelhafte Charakteristika aufweisen, wurden sie in der Klassifikation als eigene Entitäten aufgenommen.

Immunphänotypische Charakteristika der neuen Entitäten:

AML mit t(8;21): Der typische Immunphänotyp: CD34 auffallend stark exprimiert, CD19 positiv, CD56 positiv und CD15 positiv [70]. CD4 und CD14 Expression fehlt meist [53].

Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17): siehe unter AML M3.

AML mit abnormen Knochenmarkseosinophilen mit inv(16): siehe unter AML M4Eo

AML mit 11q23 Irregularitäten: Baer et al.: 80 bis 100 % der Fälle mit 11q23 Translokationen exprimierten HLADR, CD4dim, CD11b, CD13, CD15, CD32, CD33, CD38 und CD64. CD34 wurde in 42, CD56 in 39, CD3 in 16, CD2 und CD7 in je 5 % der Fälle exprimiert. Morphologischer Subtyp war M4 und M5[71].

B-ALL	Prä-prä B (pro-B)	common B	prä-B	mature B
cytlgM	-	-	+	-
CD10	-	+	+/-	+/-
slg	-	-	-	+
cytCD22	+			
CD19	+	+	+	+
HLADR	+	+	+	+
CD20	variabel	variabel	variabel	+
CD34	+/-	+/-	-/+	-
TdT	+	+	+	-
CytCD79a	+	+	+	+

V. AKUTE LYMPHATISCHE LEUKÄMIE

Die Beschreibung der durchflußzytometrischen Charakteristika der akuten lymphatischen Leukämien gestaltet sich einfacher, da der Immunphänotyp eine wesentliche Rolle bei der Einteilung der ALLs spielt, während die FAB Klassifikation in den Hintergrund getreten ist.

B-ALL

CD45 ist oft schwach exprimiert und kann gelegentlich fast negativ sein. CytCD79a verdrängt teilweise cytCD22 aus den Panels. CytCD79a soll physiologischerweise zu den frühesten B-Zellmarkern gehören und noch vor CD19 nachweisbar sein [72].

Empfehlungen der EGIL: zur Definition der B-Linie sollten von den Markern CD19, cytCD22 und cytCD79a mindestens 2 nachweisbar sein [2].

T-ALL

Wenn CD3 an der Oberfläche exprimiert wird, dann meist schwächer als auf normalen T-Zellen. Auch CD45 ist schwächer exprimiert als auf normalen Lymphozyten. Garand et al.: In dieser Studie wurde die T-ALL nur in pro T-ALL und Late T-ALL eingeteilt, wobei für die Definition der pro T-ALL nicht die in der T-ALL Tabelle genannten Kriterien zur Anwendung kamen [73]. Dennoch sind manche Ergebnisse informativ: unter den pro T-ALLs zeigten 28 % der Fälle HLA-DR, 55 % der Fälle CD34, 23 % der Fälle CD10, 0 % der Fälle B-Zellmarker und 27 % der Fälle myeloische Antigenexpression.

unter den late T-ALLs zeigten 3 % der Fälle HLA-DR, 19 % der Fälle CD34, 34 % der Fälle CD10, 0 % der Fälle B-Zellmarker und 5 % der Fälle Myeloische Antigenexpression.

EGIL-Empfehlung: CD3 cytoplasmatisch oder an der Oberfläche definiert die T-ALL. Expression von CD2 und CD7 reicht nicht aus. CD1a positive T-ALL gilt als common T-ALL unabhängig von der Reaktion von membran-CD3. Die Unterscheidung von α/β -Rezeptor und γ/δ -Rezeptor T-ALL sollte vorgenommen werden [2].

T-ALL	Pro T-ALL	Prä T-ALL	Kortikale T-ALL	Reife T-ALL
Tdt	+	+	+	+/-
HLADR	+/-	-	-	-
CD34	häufig +		-	-
CytCD3	+	+	+/-	-
CD10	+/-	+/-	-/+	-
CD7	+	+	+	+
CD5	-	+	+	+
CD2	-	+	+	+
CD1a	-	-	+	-
CD3	-	-	-/+	+
CD4/8 Coex.	-	-	+	-
CD4 oder 8	-	-	ev +	+

EXPRESSION MYELOISCHER ANTIGENE BEI ALL (My+ ALL)

Die Inzidenz dürfte bei Erwachsenen bei ca. 8 %, bei Kindern bei 18 % liegen [75]. Studien, bei denen die lymphatische Linie der Blasten nicht ausreichend abgesichert wurde, sind schwer einzuschätzen. Diese beschrieben teilweise kein My+ ALL sondern das Auftreten myeloischer Antigene bei unreifen myeloischen Blasten und kommen daher auf einen zu großen Prozentsatz My+ ALLs. Die meisten Studien untersuchten CD13, CD14, CD15, CD33 und CDw65. Zwischen diesen Antigenen ergaben sich keine signifikanten Frequenzunterschiede [75].

EXPRESSION MYELOISCHER ANTIGENE BEI ALL IM KINDESALTER [74]								
	MyAg+	CD15	CD65	CD33	CD13	CD14	CD11b	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Prae-prae-B ALL	29	11 (38)	6 (20.6)	6 (20.6)	3 (10.3)	2 (6.8)	2 (6.8)	3 (10.3)
Common ALL	572	178 (31)	27 (4.7)	34 (5.9)	84 (14.6)	88 (15.3)	31 (5.4)	37 (6.4)
Prae-B-ALL	185	67 (36.2)	20 (10.8)	23 (12.4)	31 (16.7)	37 (20.0)	11 (5.9)	12 (6.4)
T-ALL	122	35 (28.6)	8 (6.5)	13 (10.6)	12 (9.8)	15 (12.2)	5 (4.0)	12 (9.8)
Gesamt	908	291 (32)	61 (6.7)	76 (8.3)	130 (14.3)	142 (15.6)	49 (5.3)	64 (7.0)

Ein Fall wurde als Antigen-positiv betrachtet, wenn mehr als 20 % der Blasten Antigen-positiv war. Ob man CD15 und CD11b als rein myeloische Antigene betrachtet ist diskussionswürdig. In jedem Fall zeigt die Tabelle aber, daß man mit dem Auftreten dieser Antigene bei ALLs rechnen muß.

Adhäsionsmoleküle

Vila et al.: Serie: 40 Fälle vom AML: CD49b, CD49d, CD49e wurden auf 29, 60 bzw. 61 % aller ALL-Fälle exprimiert. Es konnte keine Korrelation zur FAB-Klassifikation oder den immunologischen Subtypen gefunden werden [60].

Archimbaud et al.: Serie: 29 Fälle von ALL: CD58 fand sich durchschnittlich auf 43±32 % aller Leukämiezellen, CD54 auf 11±11 % [62].

De Waele et al.: Serie: 10 AML, 8 B-Linien-ALLs, 6 normale Knochenmarke. CD34+ Zellen in AML und ALL hatten eine geringere Expression von VLA-2 und VLA-3 und eine höhere Expression von ICAM-1 und LFA-3 als CD34+ Zellen des normalen Knochenmarks. AML CD34+ Zellen zeigten weniger L-Selectin aber mehr VLA-5 als normale myeloide CD34+ Zellen. B-Linien ALL zeigten eine Überexpression von LFA-3. Die Autoren halten die abnorme Adhäsionsmolekülausprägung als Unterscheidungsmerkmal zur MRD-Erkennung für geeignet [63].

WHO KLASSIFIKATION DER AKUTEN LYMPHATISCHEN LEUKÄMIEN [13]

(Die FAB Klassifikation (L1-L3) wurde verlassen.)

1. Precursor B-Zell ALL

Zytogenetische Untergruppen: t(9;22), t(v;11q23), t(1;19), t(12;21)

2. Precursor T-Zell ALL

3. Burkitt-Zell-Leukämie

(wenn auch nicht immer alle leukämischen Zellen das Antigen exprimieren). Die Grenze zwischen Akuter Leukämie mit Expression von linienfremden Antigenen zur biphänotypischen Leukämie ist nicht scharf. Die EGIL hat daher Richtlinien zu deren Definition veröffentlicht (siehe Tabelle)[2].

"Biphänotypische akute Leukämien" müssen einen Punktwert >2 für die myeloische Reihe *und* eine der lymphatischen Reihen erreichen.

"ALL mit Koexpression myeloischer Antigene" müssen einen Punktwert >2 für eine der lymphatischen Reihen und einen Punktwert ≤ 2 für die myeloische Reihe erreichen.

"AML mit Koexpression lymphatischer Antigene" müssen einen Punktwert >2 für die myeloische Reihen und einen Punktwert ≤ 2 für die lymphatischen Reihen erreichen.

BILINEÄRE LEUKÄMIEN

Es liegen zwei unabhängige Zellpopulationen vor, die zu unterschiedlichen Linien (z.B. B-lymphatisch und myeloisch) gehören. Kommen selten vor.

AKUTE UNDIFFERENZIERTE LEUKÄMIE (AUL)

Die Gruppe der Leukämien, die sich weder morphologisch/zytochemisch noch immunologisch einer Linie zuordnen lassen, ist sehr klein geworden und macht

VI. BIPHÄNOTYPISCHE, BILINEÄRE, UNDIFFERENZIERTE AKUTE LEUKÄMIEN UND MINIMAL RESIDUAL DISEASE

BIPHÄNOTYPISCHE AKUTE LEUKÄMIEN

Es liegt eine leukämische Zellpopulation vor, die Antigene verschiedener Linien exprimiert

EGIL-Score für biphänotypische Leukämien [2]			
Punkte-wert	B-lymphatisch	T-lymphatisch	Myeloisch
2	CD79 (cyt/membran) CD22 (cyt/membran) cytIgM	CD3 (cyt/membran) TCR-α/β TCR-γ/δ	MPO
1	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10	CD13 CD33 CDw65
0.5	TdT CD24		CD14 CD15 CD64 CD117

weniger als 1 % aller Leukämien aus. Die Definition der AUL war und ist aber bei verschiedenen Studien unterschiedlich. Eine etwas ältere Studie [76] definiert die AUL durch das Vorhandensein eines oder mehrerer der Antigene HLA-DR, CD34, TdT und CD7 bei Abwesenheit von CD22, CD33, CD13, CD19, CD10, CD37, CD2, CD14, Glykophorin A und CD61. Dabei fällt das Fehlen des Einsatzes von zytoplasmatischen Markern auf. Modernere Definitionen sprechen von einer AUL beim ausschließlichen Vorhandensein Progenitor-Zell assoziierter Antigene (CD7, CD34, CD117, HLA-DR, TdT)[27].

MINIMALE REST ERKRANKUNG / MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD)

Die Sensitivität der durchflußzytometrischen Verlaufskontrolle von hämatologischen Erkrankungen hängt vom Phänotyp der malignen Zellen ab. Je mehr sich dieser von dem normaler Zellen unterscheidet und je geringer die Anzahl der Zellen ist, die im gesunden Knochenmark/Blut den gleichen Phänotyp haben, desto empfindlicher ist die durchflußzytometrische Verlaufskontrolle.

Prinzipiell können abnorme quantitative Antigenexpressionen, asynchrone und aberrante Antigenexpression (wozu auch das Fehlen von Antigenen zu rechnen ist) zur Verlaufsbeobachtung genützt werden.

AML:

CD34/CD56 wäre geeignet für die Verlaufsbeobachtung einer AML, die diesen Phänotyp aufweist [77].

Expression von CD7, CD2, TdT, CD5 auf den myeloischen Leukämiezellen. Koexpression von CD34 und CD15. Myeloische Vorläufer, die CD13+ aber CD33-sind, bzw. CD33+ aber CD13-. Zellen, die nur mit einem von zwei verschiedenen CD14-Klons reagieren (z.B. MY-4+ aber MφP9-)[64].

Für MRD-Untersuchungen nützlichen asynchrone Antigenexpressionen beschreiben auch Macedo et al. bei AML: CD34+CD56+, CD34+CD11b+, CD34+CD14+, CD117+CD15+, CD33-CD13+, CD13-CD15+. Daneben fanden sie auch Antigenüberexpressionen (CD13, CD33, CD15, CD14) und lymphatische Koexpressionen (CD2, CD5, CD7, CD19)[78].

B-ALL:

Expression von CD13, CD15, CD11b, CD7 oder CD14 auf den B-ALL-Zellen. Koexpression von CD34 mit CD22 [64].

Boccuni et al.: CD66c ist im normalen Knochenmark nur auf myeloiden Zellen exprimiert, wobei Promyelozyten die höchste Expression zeigen. Es fand sich in 24 % aller AML M4 Fälle und selten auch in anderen FAB Gruppen. Bei akuter Promyelozytenleukämie fehlte CD66c in 9 von 19 Fällen, die Expression konnte aber in-vitro durch all-trans Retinoinsäure erzeugt werden [56].

87 % aller CD10-positiven, frühen B-ALL Fälle waren CD66c positiv, während bei früher CD10-negativer B-

ALL und bei Oberflächen-Ig-positiven (also bei reifer B-ALL) CD66c nicht nachweisbar war. Doppelfärbungen CD66c/CD10 könnten für die Unterscheidung normale B-Zellvorläufer / residuale B-ALL Zellen sinnvoll sein [56].

T-ALL:

Für die Verlaufskontrolle der T-ALL bietet sich z.B. CD34/CD3 oder TdT/CD3 an, da sich im normalen Knochenmark praktisch keine Zellen mit dieser Markerkombination finden [79].

Auch TdT/CD5 oder Expression von CD33 und T-Zellmarkern kann als Marker genützt werden [80].

Eine neue, hervorragend praxisbezogene Studie von Porwit-MacDonald et al. beschreibt die Möglichkeiten der MRD Erkennung mit der Kombination von CD7/CD5/CD3, CD7/CD4/CD8, CD7/CD2/CD3, CD7/CD38/CD34 sowie CD7/TdT/cytCD3 [81]. Die Arbeit beschreibt verschiedene Regionen in den Dot-Plots, in denen normale Knochenmarks T-Zellen nicht oder nur in minimaler Konzentration vorhanden sind. Findet man in diesen Regionen CD7 positive Zellen, handelt es sich daher höchstwahrscheinlich um residuale Leukämiezellen.

Caveats:

- Für akute B-Zelleukämien sind falsch positive Verlaufskontrollen durch Bestimmung von B-Zellantigenen, CD10, CD34 und TdT beschrieben. Normale B-Zellvorläufer (Hematogones) wurden fälschlich als Residualzellen der Leukämie identifiziert [82]. Der relative Anteil dieser normalen B-Zellvorläufer kann besonders bei Kindern oder im post-Chemotherapiemark vermehrt sein.

Es muß daher ein Phänotyp der Leukämiezellen gefunden werden, der nicht nur im normalen Mark sondern auch im unbeeinträchtigten therapierten Mark nicht vorkommt. Deswegen haben Versuche, bei denen die pathologischen Zellen zu normalem Blut oder Knochenmark beigemischt werden, nur geringe Aussagekraft bezüglich der Sensitivität der für die Verlaufsbeobachtung eingesetzten Strategie.

- Linienwechsel und Phänotypveränderungen sind im Verlauf hämatologischer Erkrankungen häufig beschrieben und können eine Verlaufskontrolle erheblich erschweren [79;83].

VII. CHRONISCH LYMPHOPROLIFERATIVE ERKRANKUNGEN

B-ZELLREIHE (DIVERSE QUELLEN U.A. [84],[26],[85],[86-89],[90],[91])

Siehe Tabelle.

Vorausschickend sei betont, daß sich viele chronisch B-lymphoproliferative Erkrankungsfälle mit dem In-

munphänotyp nicht sicher voneinander abgrenzen lassen. Klinische und morphologische Information sind unbedingt erforderlich.

B-CLL

Diese häufigste aller Leukämieformen hat ein durchflußzytometrisch oft eindeutiges Muster: CD19 positive B-Zellen, die CD20 schwach, Leichtkette (kappa oder lambda) schwach, CD5 stark positiv (jedoch etwas schwächer als normale T-Zellen) und CD23 positiv. Auffällig ist auch eine schwache Expression von CD22 und FMC7, wobei das letztere Merkmal aber mit CD20 streng korreliert ist und eine Bestimmung überflüssig scheint [5]. Als ausgezeichnetes Merkmal wurde auch die Negativität der CLL-Zellen für CD79b beschrieben [86], andere Autoren fanden aber bis zu 16% aller (CD5 und 23 positiven) CLL-Fälle CD79b positiv [91].

"Atypische CLL": Manche Formen der B-CLL weichen von diesem typischen Muster ab. Dennoch sollte man diese Fälle nicht als atypische B-CLL klassifizieren, man dürfte sie bestenfalls als immunphänotypisch atypische CLLs bezeichnen.

Der Begriff atypische CLL ist morphologisch definiert und beschrieb ursprünglich 2 CLL Formen:

a) Formen, die eine Mischung von kleinen Lymphozyten und Prolymphozyten (größere Zellen, mehr Zytoplasma, Kernkörperchen aber grobes Chromatin) aufweisen. Der Prolymphozytenanteil muß dabei zwischen 10 und 55% liegen.

b) Formen, die eine Mischung von kleinen und großen Lymphozyten aufweisen, bei denen die großen Zellen über 10% ausmachen, der Prolymphozytenanteil aber unter 10% liegt.

Auch gekerbte CLL Lymphozyten werden von manchen als atypische CLL Zellen bezeichnet.

Prognosefaktoren

Die Durchflußzytometrie hat bei der CLL oft nur absichernde Funktion, da das typische morphologische Bild (kleine Zellen grobes Chromatin mit typischem Muster) und die klinische Symptomatik die Diagnose ermöglichen. Umso interessanter erscheinen prognostische Faktoren, die sich aus der Immunphänotypisierung ableiten lassen. Leider sind die Ergebnisse nicht einheitlich. Eine immunhistologische Studie beschreibt eine schlechte Prognose assoziiert mit starker CD44-Expression und dem Fehlen von CD11c während die Expression von CD11a, CD11b, CD18 und CD25 keinen Einfluß zeigte [92]. Andere fanden keine Korrelation von CD11a, CD18, CD29, CD44, CD49d, CD49e, und CD55 mit klinischen Befunden [93], eine schlechtere Prognose für CD25-exprimierende CLL-Fälle wurde hingegen beschrieben [94].

Eine neuere Studie beschreibt signifikant schlechtere Prognosen für die Aberrationen 17p und 11q [95] frühere Studien deuteten auf schlechtere Prognosen für die Trisomie 12 hin. Für die Durchflußzytometrie stellt sich die Frage, wie man diese Veränderungen aus dem Immunphänotyp vorhersagen kann.

Trisomie 12: Stärkere CD20, FMC7, CD11a, CD38 und Leichtkettenexpression Expression [96-98], auch das Fehlen von CD23 wurde als Zeichen für Trisomie 12 angesehen [97].

11q-Deletion: Sembries et al. konnten zeigen, daß diese CLL-Form im Gegensatz zu Formen ohne Deletion signifikant niedrigere Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a/CD18 (integrin alphaL/beta2), CD11c/CD18 (integrin alphaX/beta2), CD31 (PECAM-1), CD48, und CD58 (LFA-3) aufwiesen und darüberhinaus weniger CD45, CD6, CD35 und CD39 exprimierten. Die verminderte Expression von CD45 und eine Expression von CD49d korrelierten mit vermindertem Überleben.

PLL

Bei der Prolymphozytenleukämie sind CD20 und die Leichtkette (kappa oder lambda) meist stark exprimiert, CD5, CD23 und CD11c meist negativ [91]. Eine Abgrenzung von immunphänotypisch atypischen CLLs kann aber fallweise schwierig sein. Die PLL zeichnet sich aber auch durch klinische (prominente Splenomegalie, geringe Lymphknotenbeteiligung, deutliche Lymphozytose) und morphologische Besonderheiten (Prolymphozyten >55%) aus.

Entstand die PLL aus einer CLL zeigt sie oft eine schwächere Leichtkettenexpression und kann CD5 positiv sein.

HCL

Der typische Immunphänotyp der Haarzelleukämie ist CD20 stark, CD103 positiv, CD11c außerordentlich stark positiv und CD25 positiv (stärker als eine CLL). Die Leichtkettenexpression ist stärker als bei CLL aber schwächer als bei PLL [91;99]. Dazu kommen noch typische klinische Befunde wie Splenomegalie, Panzytopenie, Monozytopenie (mit dem Mikroskop nachzuweisen, Hämautomaten zählen die Haarzellen eventuell zu den Monozyten und "übersehen" daher die Monozytopenie).

SLVL, MZL

Das Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes (Milz-Lymphom mit zottigen Lymphozyten) und das Marginalzonenlymphom haben keinen wirklich typischen Immunphänotyp. Klinik und Morphologie wichtig.

	CLL/ SLL	IC	PLL	MCL	HCL	HCLv	FCL	MZL	SLVL	MM
surf.IG	schw +	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD5	+	- bis schw +	- bis schw +	+	-	+ 8 % d.F.	-	-	+ 19 % d.F.	-
CD10	-	-	-	-	- selten +	+ 21 % d.F.	+(-)	- bis schw +	+ 30 % d.F.	-/+
CD11c	- bis mittel +	-/+	-/+	-	stark +	+ 79 % d.F.	-	+/-	+ 47 % d.F.	-
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD20	schw +	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CD22	- bis schw +	+	+/-	+	+	+ 96 % d.F.	+	+	+ 95 % d.F.	-
CD23	+	-	-/+	-	-	+ 7 % d.F.	+/-	-/+	+ 31 % d.F.	-
CD24	+	+/-	+	+	+	+ 21 % d.F.	+		+ 89 % d.F.	-
CD25	- bis schw +	- bis schw +	-	-	+	+ 0 % d.F.	-		+ 25 % d.F.	-
CD38	- bis schw +	+/-	-		selten +	+ 11 % d.F.			+ 30 % d.F.	stark +
CD43	+	+	+	+	-	-	-	-/+	-	-
CD79b	-	+	+	+	+	+	+		+	-
CD103	-	-	-	-	+	+ 47 % d.F.	-		+ 15 % d.F.	-
CD138	-	-	-	-	-		-			+
FMC7	-	+	+	+	+	+ 73 % d.F.	+		+ 89 % d.F.	-

CLL: Chronisch lymphatische Leukämie; SLL: Small Lymphocytic Lymphoma; IC: Immunozytom; PLL: Prolymphozytenleukämie; MCL Mantelzellymphom; HCL Haarzelleukämie; HCLv: Haarzelleukämie, variant-Form; FCL: Follikelzentrumszell Lymphom; MZL: Marginalzonenlymphom; SLVL: Splenic Lymphoma With Villous Lymphocytes; MM: Multiples Myelom.

IC

Auch das Immunozytom besitzt keinen typischen Phänotyp, durch den es sich von anderen B-NHL sicher abgrenzen läßt. Die manchmal genannten Kriterien (fehlende CD5 Expression, starke CD38 Expression) sind in unserer Erfahrung nicht zuverlässig. Klinik und Morphologie sind daher auch bei dieser Entität wichtig.

MCL

Das Mantelzellymphom ist wie die CLL meist CD5 positiv, im Gegensatz zur CLL aber CD20 stärker, Leichtkettenexpression stärker und CD23 negativ. Eine Translokation t(11;14), bzw. eine Cyclin D1 Überexpression kommt bei den meisten Fällen von MCL vor [91].

FCL

Auch das Follikelzentrumszell Lymphom kann ausschwemmen. Typischer Immunphänotyp: CD10 positiv (ca.85% der Fälle), CD5 negativ. Die Leichtketten sind unterschiedlich stark exprimiert und können leider

auch ganz fehlen. Analysiert man Lymphknoten, kann man bei Fehlen der Leichtkettenexpression die Monoklonalität nicht mehr beweisen und hat eventuell Schwierigkeiten, reaktive Veränderungen von malignen abzugrenzen. Ein cytoplasmatischer Nachweis von Bcl-2 in den B-Zellen (bei FCL stark exprimiert, bei reaktiven Follikelzentrumszellen fehlend) kann dann weiterhelfen [100].

MM (Multiples Myelom)

Als typischer Immunphänotyp der Plasmazellen wird meist CD45 schwach bis negativ und CD38 stark positiv angesehen. Tatsächlich lassen sich durch diese einfache Doppelfärbung normale wie maligne Plasmazellen meist gut darstellen. Die normalen Plasmazellen zeigen dabei meist eine CD38 Expression, die etwas über der aller anderen normalen hämatopoetischen Zellen liegt (am nächsten kommen Basophile und Lymphozyten) und eine CD45 Expression, die oft einen Verlauf von schwach bis mittelstark zeigt.

Maligne Plasmazellen sind schwieriger vorhersagbar. So kann ihre CD38 Expression von auffallend stark (am Rand des Meßbereichs konzentriert) bis zu unüblich schwach reichen. Auch die CD45 Expression ist sehr

variabel. Für die Abnormität einer Plasmazellpopulation sprechen unserer Erfahrung nach: extrem starke CD38 Expression, auffallend schwache CD38 Expression (da bleibt aber dann natürlich die wichtige Frage, ob es überhaupt Plasmazellen sind), völliges Fehlen einer CD45-Expression, völliges Fehlen einer CD19 Expression sowie die Expression von CD56. Ähnliche Ergebnisse wurden von Ocqueteau

et al. veröffentlicht, der noch zusätzlich eine CD28 Expression auf 47% aller Fälle von monoklonalen, nicht aber auf polyklonalen Plasmazellpopulationen beschreibt [101]. CD138 fand sich auf allen mono- und polyklonalen Plasmazellpopulationen.

Zur Unterscheidung von MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance) und MM hilft der Nachweis monoklonaler Plasmazellen wenig, da diese bei beiden Krankheitsbildern auftreten. Ein wichtiges Kriterium soll aber der Anteil der monoklonalen Zellen sein: Bei nur 1.5% aller Myelome, aber bei 98% aller MGUS-Fälle machten die normalen, polyklonalen Plasmazellen mehr als 3% aller Plasmazellen aus [101].

T-ZELLREIHE

Die neue WHO Klassifikation verneint die Relevanz der Unterteilung der zytologischen Subklassifikation der peripheren (auch postthymisch genannten) T-Zellymphome. Nicht einmal die Abgrenzung T vs. NK reicht aus, um bestimmte Entitäten zu definieren. Das klinische Syndrom hingegen und die Lokalisation (im besonderen nodal vs. extranodal) sind wichtig, um das biologische Verhalten des Tumors zu beschreiben. Das klinische Syndrom ist demnach für die Definition der T und NK-Zell-Neoplasmen wichtig [13].

Die Entitäten sind auch immunphänotypisch schlecht abgrenzbar (siehe Tabelle): Während der typische Phänotyp von T-PLL, Sezarysyndrom und ATLL einigermaßen definiert ist, gibt es bei den LGL-Leukämien/Lymphomen große Diskrepanzen in der Literatur.

- **T-LGL:** Selten Lymphadenopathien; Kerne meist nicht konvuliert; breiter Zytoplasmasaum; deutlich sichtbare azurophile Granula. Klonalität durch TCR-rearrangement beweisbar. Phänotyp siehe unten.

	T-LGL	NK-LGL	T-PLL	Sezary-Syndrom	ATL
CD2	+	+	+	+	+
CD3	+	-	+	+	+
CD4	-	-	+(-)	+	+
CD5	-	-	+	+	+/-
CD7	+/-	+/-	+	-	-
CD8	+	+/-	-(/+)*	-	-
CD16	-/+	+/-	-	-	-
CD25	-	-	-	-	+
CD56	-	+/-	-	-	-
CD57	+/-	-/+	-	-	-
HLA-DR	-	-	-/+	-	+/-
CD4+CD8+			möglich		selten
TdT	-	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-

* wenn CD8 dann meist als Koexpression mit CD4

T-LGL: Large Granular Lymphocyte Leukemia (LGL), T-Zelltyp; NK-LGL: LGL Leukemia, NK-Zelltyp; T-PLL: T-Prolymphozytenleukämie; ATLL: Adult T-Cell Leukemia

Verlauf: eher indolenter, chronischer Verlauf [102]. Aggressive Varianten beschrieben [103].

- **NK-LGL:** Selten Lymphadenopathien; Kerne meist nicht konvuliert; meist breiter Zytoplasmasaum; deutlich sichtbare azurophile Granula. Klonalität schwer beweisbar.

Verlauf: aggressive und chronische T-LGL-artige Verläufe kommen vor [102].

In der Literatur herrscht über den Immunphänotyp der beiden vorgenannten Entitäten keine Einigkeit. Kingreen&Siegert geben für die T-LGL Leukämie die Markerkombination CD3+/CD56-/CD57+ und für die NK-LGL Leukämie CD3-/CD56+/CD57- als typisch an [102]. Gentile et al. sehen die T-LGL im allgemeinen CD3+, CD8+, CD16+, CD56- und CD57+, beschreiben aber eine Variante, die auch CD56+ ist und einen aggressiven Verlauf zeigt. Die Autoren spekulieren dementsprechend, ob die CD56 Expression die biologische Aggressivität bedingt [103].

Während über CD3 definitionsbedingt größere Einigkeit herrscht, wird die Expression von CD56, CD57, CD16 und CD8 sehr unterschiedlich beurteilt.

- **T-PLL:** Häufig Lymphadenopathien; Kerne meist mit unregelmäßigen Ausbuchtungen ("knobby type"; Spektrum reicht bis zu vielfach gelappten oder auch Sezary-ähnlichen Zellen); meist schmaler Zytoplasmasaum; frei von größerer Granula

Anmerkung: zur T-PLL zählen einerseits Erkrankungen, die bis auf einen schmälere Zytoplasmasaum der B-PLL ähneln (können aber auch eine unregelmäßige Kernkontur haben), und andererseits kleinzelligere Varianten (von manchen auch als small cell variant of T-PLL bezeichnet) mit unregelmäßiger Kernkontur .

CD7 meist positiv, Koexpressionen von CD4 und CD8 kommen vor, CD3 kann fehlen.

Aktivierungsmarker CD25 und/oder HLA-DR können positiv sein.

- **Sezary-Syndrom [85]:** Cerebriforme Kerne; Häufigster Phänotyp: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD7-, CD8-, CD25-

- **ATLL [85]:** Flower Cells (= vielfache Einschnürungen), Zellgröße und Aussehen von Zelle zu Zelle unterschiedlich (Polymorphie). Häufigster Phänotyp: CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, **CD7-**, CD8-, **CD25+** Selten auch Koexpression von CD4 und CD8

LITERATUR

1. Rothe G, Schmitz G: Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996; 10: 877-895.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9: 1783-1786.
3. Lacombe F, Durrieu F, Briais A, et al: Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1878-1886.
4. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT: Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am.J Clin.Pathol.* 1993; 100: 534-540.
5. Hubl W, Iturraspe J, Braylan RC: FMC7 antigen expression on normal and malignant B-cells can be predicted by expression of CD20 [see comments]. *Cytometry* 1998; 34: 71-74.
6. Knapp W, Strobl H, Majdic O: Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994; 18: 187-198.
7. Pirruccello SJ, Lang MS: Differential expression of CD24-related epitopes in mycosis fungoides/Sezary syndrome: a potential marker for circulating Sezary cells. *Blood* 1990; 76: 2343-2347.
8. Imamura N, Ota H, Kuramoto A: CD7 false-positive acute myelogenous leukemia and promyelocytic leukemia cell line HL-60: characterization of CD7 epitopes by four monoclonal antibodies. *Am.J Hematol.* 1991; 38: 72-74.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French- American-British (FAB) co-operative group. *Br.J Haematol.* 1976; 33: 451-458.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.* 1985; 103: 620-625.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.* 1985; 103: 460-462.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO) [see comments]. *Br.J Haematol.* 1991; 78: 325-329.
13. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin.Oncol.* 1999; 17: 3835-3849.
14. Villamor N, Zarco MA, Rozman M, Ribera JM, Feliu E, Montserrat E: Acute myeloblastic leukemia with minimal myeloid differentiation: phenotypical and ultrastructural characteristics [see comments]. *Leukemia* 1998; 12: 1071-1075.
15. Flandrin G: The Classification of Acute Myeloid Leukaemias (AML) and Myelodysplastic Syndromes (MDS). In: The 6th European Tutorial on Hematopathology . Catovsky D, Flandrin G, Diebold J, Mason DY, eds. London: European School of Haematology, 1996; 1-28.
16. Buccheri V, Shetty V, Yoshida N, Morilla R, Matutes E, Catovsky D: The role of an anti-myeloperoxidase antibody in the diagnosis and classification of acute leukaemia: a comparison with light and electron microscopy cytochemistry. *Br.J Haematol.* 1992; 80: 62-68.
17. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, et al: Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. *Blood* 1997; 89: 621-629.
18. Nguyen PL, Olszak I, Harris NL, Preffer FI: Myeloperoxidase detection by three-color flow cytometry and by enzyme cytochemistry in the classification of acute leukemia [see comments]. *Am.J Clin.Pathol.* 1998; 110: 163-169.
19. Taylor CG, Stasi R, Bastianelli C, et al: Diagnosis and classification of the acute leukemias: recent advances and controversial issues. *Hematopathol.Mol.Hematol.* 1996; 10: 1-38.
20. Kotylo PK, Seo IS, Smith FO, et al: Flow cytometric immunophenotypic characterization of pediatric and adult minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Am.J Clin.Pathol.* 2000.Feb.;113.(2.):193-200. 113: 193-200.
21. Segeren CM, de Jong-Gerrits GC, van 't V: AML-MO: clinical entity or waste basket for immature blastic leukemias? A description of 14 patients. Dutch Slide Review Committee of Leukemias in Adults. *Ann.Hematol.* 1995; 70: 297-300.
22. Cohen PL, Hoyer JD, Kurtin PJ, Dewald GW, Hanson CA: Acute myeloid leukemia with minimal differentiation. A multiple parameter study [see comments]. *Am.J Clin.Pathol.* 1998; 109: 32-38.
23. Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, et al: Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br.J Haematol.* 1998; 102: 1035-1041.
24. Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA: The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French- American-British classification, and karyotypic abnormalities. *Am.J Clin.Pathol.* 1998; 109: 211-220.
25. Orfao A, Vidriales B, Gonzalez M, Lopez-Berges MC, Canizo C, San Miguel JF: Diagnostic and Prognostic Importance of Immunophenotyping in Adults with Acute Myeloid Leukemia. In: Recent Advances in Cell Biology of Acute Leukemia. Ludwig WD, Thiel E, eds. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1993; 369-379.
26. Ludwig WD, Komischke B, Böttcher S, Martin M: Immunphänotypisierung akuter Leukämien und Leukämisch verlaufender niedrig-maligner Non-Hodgkin-Lymphome (Methoden, relevante Antigene, Interpretation). In: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schmitz G, Rothe G, eds. Stuttgart New York: Schattauer Verlag, 1994; 77-104.
27. Ludwig WD: Immunphänotypisierung akuter lymphatischer und akuter myeloischer Leukämien. In: Labor und Diagnose. Thomas L, ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998; 551-556.
28. Bain BJ: Leukemia Diagnosis. A Guide to the FAB Classification. London: Mosby-Year Book Europe Limited, 1990;
29. Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, et al: CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica* 1998; 83: 392-397.
30. Piedras J, Lopez-Karpovitch X, Cardenas R: Light scatter and immunophenotypic characteristics of blast cells in typical acute promyelocytic leukemia and its variant. *Cytometry* 1998; 32: 286-290.
31. Erber WN, Asbahr H, Rule SA, Scott CS: Unique immunophenotype of acute promyelocytic leukaemia as defined by CD9 and CD68 antibodies. *Br.J Haematol.* 1994; 88: 101-104.
32. Biondi A, Luciano A, Bassan R, et al: CD2 expression in acute promyelocytic leukemia is associated with microgranular morphology (FAB M3v) but not with any PML gene breakpoint. *Leukemia* 1995; 9: 1461-1466.
33. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA: Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia [see comments]. *N.Engl.J Med.* 1999; 340: 994-1004.
34. Edwards RH, Wasik MA, Finan J, et al: Evidence for early hematopoietic progenitor cell involvement in acute promyelocytic leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 1999; 112: 819-827.
35. Exner M, Thalhammer R, Kapiotis S, et al: The "typical" immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL-M3): does it prove true for the M3-variant? *Cytometry* 2000.Apr.15.;42.(2.):106-9. 42: 106-109.
36. Adriaansen HJ, te BP, Hagemeyer AM, van der Schoot CE, Delwel HR, van Dongen JJ: Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression . *Blood* 1993; 81: 3043-3051.
37. Dunphy CH: Comprehensive review of adult acute myelogenous leukemia: cytomorphological, enzyme cytochemical, flow cytometric immunophenotypic, and cytogenetic findings. *J Clin.Lab.Anal.* 1999; 13: 19-26.
38. Krasinskas AM, Wasik MA, Kamoun M, Schretzenmair R, Moore J, Salsbery KE: The usefulness of CD64, other monocyte-associated

- antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *Am.J Clin.Pathol.* 1998; 110: 797-805.
39. Goldberg SL, Noel P, Klumpp TR, Dewald GW: The erythroid leukemias: a comparative study of erythroleukemia (FAB M6) and Di Guglielmo disease. *Am.J Clin.Oncol.* 1998; 21: 42-47.
40. Garand R, Duchayne E, Blanchard D, et al: Minimally differentiated erythroleukaemia (AML M6 'variant'): a rare subset of AML distinct from AML M6. *Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire. Br.J Haematol.* 1995; 90: 868-875.
41. Mazzella FM, Kowal-Vern A, Shrit MA, et al: Acute erythroleukemia: evaluation of 48 cases with reference to classification, cell proliferation, cytogenetics, and prognosis. *Am.J Clin.Pathol.* 1998; 110: 590-598.
42. Nakase K, Sartor M, Bradstock: Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute leukemia. *Cytometry* 1998; 34: 198-202.
43. Kowal-Vern A, Cotelingam J, Schumacher HR: The prognostic significance of proerythroblasts in acute erythroleukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 1992; 98: 34-40.
44. Villeval JL, Cramer P, Lemoine F, et al: Phenotype of early erythroblastic leukemias. *Blood* 1986; 68: 1167-1174.
45. Drach J, Nachbaur D, Pohl P, Lechleitner M, Gattringer C, Huber H: Akute Leukämien. In: *Diagnostische Hämatologie*. Huber H, Löffler H, Pastner D, eds. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1992; 223-282.
46. van der Schoot CE, Daams GM, Pinkster J, Vet R, von dem B: Monoclonal antibodies against myeloperoxidase are valuable immunological reagents for the diagnosis of acute myeloid leukaemia [see comments]. *Br.J Haematol.* 1990; 74: 173-178.
47. Traweek ST, Liu J, Brazier RM, Johnson RM, Byrnes RK: Detection of myeloperoxidase gene expression in minimally differentiated acute myelogenous leukemia (AML-M0) using in situ hybridization. *Diagn.Mol.Pathol.* 1995; 4: 212-219.
48. Farahat N, Lens D, Morilla R, Matutes E, Catovsky D: Differential TdT expression in acute leukemia by flow cytometry: a quantitative study. *Leukemia* 1995; 9: 583-587.
49. Janossy G, Coustan-Smith E, Campana D: The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia* 1989; 3: 170-181.
50. Rani S, De Oliveira MS, Catovsky D: Different expression of CD3 and CD22 in leukemic cells according to whether tested in suspension or fixed on slides. *Hematol.Pathol.* 1988; 2: 73-78.
51. Pombo dOM, Matutes E, Rani S, Morilla R, Catovsky D: Early expression of MCS2 (CD13) in the cytoplasm of blast cells from acute myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 1988; 80: 61-64.
52. Sperling C, Seibt-Jung H, Gassmann W, et al: Immunophenotype of Acute Myeloid Leukemia: Correlation with Morphological Characteristics and Therapy Response. In: *Recent Advances in Cell Biology of Acute Leukemia*. Ludwig WD, Thiel E, eds. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1993; 381-392.
53. Creutzig U, Harbott J, Sperling C, et al: Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* 1995; 86: 3097-3108.
54. Bettelheim P, Panzer S, Majdic O, et al: Unexpected absence of a myeloid surface antigen (3-fucosyl-N-acetyllactosamine) in promyelocytic leukemia. *Leuk.Res.* 1985; 9: 1323-1327.
55. Kafer G, Willer A, Ludwig W, Kramer A, Hehlmann R, Hastka J: Intracellular expression of CD61 precedes surface expression. *Ann.Hematol.* 1999; 78: 472-474.
56. Bocconi P, Di Noto R, Lo PC, et al: CD66c antigen expression is myeloid restricted in normal bone marrow but is a common feature of CD10+ early-B-cell malignancies. *Tissue Antigens.* 1998; 52: 1-8.
57. Muroi K, Handa K, Amemiya Y, Hakomori S, Ozawa K, Miura Y: Expression profiles of I and sialosyl-I antigens on blood cells: the sialosyl-I antigen is expressed along the monocytic differentiation. *Leuk.Res.* 1998; 22: 1029-1036.
58. Wells SJ, Bray RA, Stempora LL, Farhi DC: CD117/CD34 expression in leukemic blasts. *Am.J Clin.Pathol.* 1996; 106: 192-195.
59. Valverde LR, Matutes E, Farahat N, et al: C-kit receptor (CD117) expression in acute leukemia. *Ann.Hematol.* 1996; 72: 11-15.
60. Vila L, Thomas X, Campos L, Sabido O, Archimbaud E: Expression of VLA molecules on acute leukemia cells: relationship with disease characteristics. *Exp.Hematol.* 1995; 23: 514-518.
61. Reuss-Borst MA, Klein G, Waller HD, Muller CA: Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 869-874.
62. Archimbaud E, Thomas X, Campos L, Magaud JP, Dore JF, Fiere D: Expression of surface adhesion molecules CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in adult acute leukemia: relationship with initial characteristics and prognosis. *Leukemia* 1992; 6: 265-271.
63. De Waele M, Renmans W, Jochmans K, et al: Different expression of adhesion molecules on CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and their normal bone marrow counterparts. *Eur.J Haematol.* 1999; 63: 192-201.
64. Drach J, Drach D, Glassl H, Gattringer C, Huber H: Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992; 13: 893-901.
65. Launder TM, Bray RA, Stempora L, Chenggis ML, Farhi DC: Lymphoid-associated antigen expression by acute myeloid leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 1996; 106: 185-191.
66. Suzuki R, Yamamoto K, Seto M, et al: CD7+ and CD56+ myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia: a distinct hematolymphoid disease entity. *Blood* 1997; 90: 2417-2428.
67. Dunphy CH, Gregowicz AJ, Rodriguez GJ: Natural killer cell acute leukemia with myeloid antigen expression. A previously undescribed form of acute leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 1995; 104: 212-215.
68. Scott AA, Head DR, Kopecky KJ, et al: HLA-DR-, CD33+, CD56+, CD16- myeloid/natural killer cell acute leukemia: a previously unrecognized form of acute leukemia potentially misdiagnosed as French-American-British acute myeloid leukemia-M3 [see comments]. *Blood* 1994; 84: 244-255.
69. Nagai M, Bandoh S, Tasaka T, et al: Secondary myeloid/natural killer cell precursor acute leukemia following essential thrombocythemia. *Hum.Pathol.* 1999; 30: 868-871.
70. Porwit-MacDonald A, Janossy G, Ivory K, et al: Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. IV. CD34 overexpression in acute myelogenous leukemia M2 with t(8;21). *Blood* 1996; 87: 1162-1169.
71. Baer MR, Stewart CC, Lawrence D, et al: Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1998; 12: 317-325.
72. Dworzak MN, Fritsch G, Froschl G, Printz D, Gadner H: Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* 1998; 92: 3203-3209.
73. Garand R, Voisin S, Papin S, et al: Characteristics of pro-T ALL subgroups: comparison with late T-ALL. *The Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies. Leukemia* 1993; 7: 161-167.
74. Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, et al: Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. *Blood* 1998; 92: 795-801.
75. Drexler HG, Ludwig WD: Incidence and Clinical Relevance of Myeloid Antigen-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. In: *Recent Advances in Cell Biology of Acute Leukemia*. Ludwig WD, Thiel E, eds. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1993; 53-66.
76. Campana D, Hansen-Hagge TE, Matutes E, et al: Phenotypic, genotypic, cytochemical, and ultrastructural characterization of acute undifferentiated leukemia. *Leukemia* 1990; 4: 620-624.
77. Moretti S, Lanza F, Castagnari B, et al: Immunophenotype definition of the stem/progenitor cell compartment. Implications for the identification of blast cells in acute leukemia. *Eur.J Histochem.* 1996; 40 Suppl 1:43-52: 43-52.
78. Macedo A, Orfao A, Vidriales MB, et al: Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann.Hematol.* 1995; 70: 189-194.
79. Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 139-152.
80. Scolnik MP, Palacios MF, Ramirez FR, Tur R, Castuma MV, Bracco MM: Trilineage phenotypic compromise in acute leukemia. *Leuk.Lymphoma.* 1999; 34: 395-399.
81. Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, et al: BIOMED-1 concerted action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000.May.;14(5):816-25. 14: 816-825.

82. Kallakury BV, Hartmann DP, Cossman J, Gootenberg JE, Bagg A: Posttherapy surveillance of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Value of polymerase chain reaction and limitations of flow cytometry. *Am.J Clin.Pathol.* 1999; 111: 759-766.
83. Oelschlagel U, Nowak R, Schaub A, et al: Shift of aberrant antigen expression at relapse or at treatment failure in acute leukemia. *Cytometry* 2000.Aug.15.;42.(4.):247-53. 42: 247-253.
84. Bettelheim P: Immunphänotypisierung von Non-Hodgkin-Lymphomen. In: Labor und Diagnose. Thomas L, ed. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998; 556-558.
85. Huber H, Fasching B, Pohl P, et al: Non-Hodgkin-Lymphome. In: Diagnostische Hämatologie. Huber H, Löffler H, Pastner D, eds. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 1992; 440-553.
86. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am.J Clin.Pathol.* 1997; 108: 378-382.
87. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al: The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8: 1640-1645.
88. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D: The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994; 83: 1558-1562.
89. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Meeus P, Catovsky D: The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk.Lymphoma.* 1994; 14 Suppl 1:57-61: 57-61.
90. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
91. D'Arena G, Keating MJ, Carotenuto M: Chronic lymphoproliferative disorders: an integrated point of view for the differential diagnosis. *Leuk.Lymphoma.* 2000.Jan.;36.(3-4.):225-37. 36: 225-237.
92. Eisterer W, Hilbe W, Stauder R, Bechter O, Fend F, Thaler J: An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br.J Haematol.* 1996; 93: 661-669.
93. Csanaky G, Matutes E, Vass JA, Morilla R, Catovsky D: Adhesion receptors on peripheral blood leukemic B cells. A comparative study on B cell chronic lymphocytic leukemia and related lymphoma/leukemias. *Leukemia* 1997; 11: 408-415.
94. Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Opin.Hematol.* 2000.Jul.;7.(4.):223-34. 7: 223-234.
95. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N.Engl.J Med.* 2000.Dec.28.;343.(26.):1910-6. 343: 1910-1916.
96. Su'ut L, O'Connor SJ, Richards SJ, et al: Trisomy 12 is seen within a specific subtype of B-cell chronic lymphoproliferative disease affecting the peripheral blood/bone marrow and co-segregates with elevated expression of CD11a. *Br.J Haematol.* 1998; 101: 165-170.
97. Finn WG, Thangavelu M, Yelavarthi KK, et al: Karyotype correlates with peripheral blood morphology and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Am.J Clin.Pathol.* 1996; 105: 458-467.
98. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al: Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br.J Haematol.* 1996; 92: 382-388.
99. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J: Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms [In Process Citation]. *Ann.Oncol.* 2000.;11.Suppl.1.:3-10. 11 Suppl 1:3-10: 3-10.
100. Cornfield DB, Mitchell DM, Almasri NM, et al: Follicular lymphoma can be distinguished from benign follicular hyperplasia by flow cytometry using simultaneous staining of cytoplasmic bcl-2 and cell surface CD20. *Am.J Clin.Pathol.* 2000.Aug.;114.(2.):258-63. 114: 258-263.
101. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, et al: Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am.J Pathol.* 1998; 152: 1655-1665.
102. Kingreen D, Siegert W: Chronic lymphatic leukemias of T and NK cell type. *Leukemia* 1997; 11 Suppl 2:S46-9: S46-S49
103. Gentile TC, Uner AH, Hutchison RE, et al: CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia [see comments]. *Blood* 1994; 84: 2315-2321.