

Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

**Analyse des B-Zell-Rezeptor-Rearrangements an
Patienten der CLL-8 Studie:
Assoziation mit Charakteristika und
Überlebenszeiten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Stefan Schönsteiner
aus Ravensburg

2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Gierschik
Tag der Promotion:	23.04.2015

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Die chronische lymphatische Leukämie (CLL).....	1
1.2 Die B-Zelle – Entwicklung und somatische Hypermutation.....	3
1.3 Modell zum zellulären Ursprung der CLL	5
1.4 Prognostische Faktoren der CLL.....	6
1.5 Fragestellung der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Patienten und Proben	10
2.1.1 Studiendesign	10
2.1.2 Materialien und Chemikalien	12
2.1.2.1 Geräte.....	12
2.1.2.2 Laborbedarf	13
2.1.2.3 Reagenzien.....	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 DNA/RNA Präparation	15
2.2.2 Herstellung von cDNA	15
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.2.3.1 Ablauf und Reaktionsprinzip der PCR	16
2.2.3.2 Primerdesign.....	17
2.2.3.3 Multiplex-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern	19
2.2.3.4 PCR mit Leaderregion-Primern.....	20
2.2.4 Qualitative Analyse amplifizierter DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese....	21
2.2.5 GeneScan® Analyse.....	22
2.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte	23
2.2.7 Sequenzreaktion.....	24
2.2.8 Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte mit DyeEx®-Spin Kit.....	25
2.2.9 Sequenzanalyse mittels AbiPrism DNA Sequenzer 3130xl	25
2.2.10 Auswertung der Sequenzen	26
2.2.11 Zytogenetische Diagnostik mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). 28	

2.2.12	Statistik	29
3.	Ergebnisse	32
3.1	Überblick	32
3.2	<i>IGHV</i> Struktur und VDJ-Verteilung.....	34
3.2.1	<i>VH1 – VH1-69</i>	36
3.2.2	<i>VH3 – VH3-21, VH3-23, VH3-30 und VH3-48</i>	38
3.2.3	<i>VH4 – VH4-34</i>	44
3.2.4	<i>VH 2, VH5, VH6 und VH7</i>	46
3.3	Kombinierter Vergleich verschiedener <i>IGHV</i> - Gen Subgruppen.....	47
3.4	Korrelation von chromosomalen Aberrationen und <i>IGHV</i> -Mutationsstatus	49
3.4.1	Deletion 17p	49
3.4.2	Deletion 13q	50
3.4.3	Deletion 11q	52
3.4.4	Trisomie 12q.....	52
4.	Diskussion	54
4.1	Prognosefaktoren bei der chronischen lymphatischen Leukämie	54
4.2	<i>IGHV</i> Status	54
4.3	Zytogenetische Veränderungen	55
4.4	Therapiemodalität und Definition des aktuellen Therapiestandards	56
4.5	Einordnung hinsichtlich Verfügbarkeit, Durchführbarkeit, Kosteneffektivität... 57	
4.6	Statistik und Fallzahl	58
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	58
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AID	activation-induced cytidine deaminase
BP	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CDR	complementary determining region
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CR	komplette Remission
DCLLSG	Deutsche CLL Studiengruppe
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EB	elution buffer
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
FC	Fludarabin/Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin/Cyclophosphamid/Rituximab
FDA	Food and Drug Administration
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FR	Framework
G	Guanin
Ggf	gegebenenfalls

H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
H ₂ O	Wasser
HoxC4	homeobox protein Hox-C4
IgA	Immunglobulin Typ A
IgD	Immunglobulin Typ D
IgG	Immunglobulin Typ G
<i>IGHV</i>	Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobulingene
IgM	Immunglobulin Typ M
IWCLL	international workshop on chronic lymphocytic leukemia
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
LR	Leaderregion
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miR	MicroRNA
mut.	mutiert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCI	National Cancer Institute
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
OS	overall survival, Gesamtüberleben
PB	peripheres Blut
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	progressive disease
PFS	progression free survival, progressionsfreies Überleben
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
SHM	somatische Hypermutation
sog.	sogenannt
T	Thymidin

Tab	Tabelle
unmut.	unmutiert
VDJ	variable – diversity – joining
<i>VH</i>	Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobulingene
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZAP-70	zeta-associated protein of 70 kDa
κ	Kappa
λ	Lambda

1. Einleitung

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Innerhalb der Gruppe der Leukämien stellt die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (CLL) mit einer Inzidenz von ca. 3-5/100.000/Jahr (*Maurer et al. 2013, Zenz et al. 2010*) im Erwachsenenalter die häufigste Form dar. In Westeuropa und Nordamerika beträgt der Anteil der CLL ungefähr 30 % (*Maurer et al. 2013*). Betroffen sind in der Regel ältere Menschen. Vor dem 4. Lebensjahrzehnt ist diese Erkrankung sehr selten. Eine Zunahme der Inzidenz findet sich in der Altersgruppe zwischen 50 und 80 Jahren (*Maurer et al. 2013*). Männer erkranken im Mittel etwa doppelt so häufig an CLL wie Frauen (M:F = 1,7:1) (*Hallek et al. 2008, Maurer et al. 2013*). Die chronische lymphatische Leukämie ist eine Erkrankung mit sehr heterogenem klinischem Verlauf (*Stilgenbauer et al. 2013*). Das Spektrum reicht dabei von Patienten, die innerhalb weniger Monate nach Diagnosestellung versterben, bis hin zu denen mit jahrelangem asymptomatischem Verlauf ohne Therapiebedürftigkeit (*Rozman and Montserrat 1995, Zwiebel and Cheson 1998, Stilgenbauer et al. 2013*). Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel in einem frühen Stadium, oft sogar als Zufallsbefund bei hausärztlichen Routinekontrollen. Klinisch äußert sich die Erkrankung ähnlich wie andere hämatologische Systemerkrankungen. Die Patienten berichten häufig über B-Symptome (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), indolente Lymphknotenschwellungen, oder ein stetes Völlegefühl, hervorgerufen durch eine Hepatosplenomegalie oder abdominelle Lymphome. Mit zunehmender Erkrankungsdauer treten Zytopenien, im Sinne von Anämien und Thrombopenien, und Infektionen in den Vordergrund. Komplizierend und prognostisch ungünstig sind autoimmunhämolytische Anämien oder die sogenannte Richter-Transformation, bei der die Erkrankung in ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom übergeht. Häufigste Todesursache bei der CLL sind nicht beherrschbare Infektionen (*Hamblin et al. 2008*).

Zytomorphologisch ist diese Erkrankung durch das Vorhandensein kleiner, reif erscheinender Lymphozyten gekennzeichnet. Daneben findet sich in der Immunphänotypisierung eine Koexpression der Oberflächenmarker CD5, CD19, CD23 und CD20. Die Klonalität der Erkrankung kann anhand der Leichtkettenrestriktion (entweder CD19/λ oder CD19/κ) bewiesen werden (*Binet et al. 2006*). Im Gegensatz zu

vielen anderen Neoplasien der B-Zell-Reihe wird der Oberflächenmarker CD20 aber relativ schwach exprimiert (*Golay et al. 2001, Pedersen et al. 2002, Hsi et al 2003*).

Ziel vergangener und gegenwärtiger Studien ist es, diese unterschiedlichen klinischen Verläufe anhand laborchemischer und molekulargenetischer Analysen zu charakterisieren, um frühzeitig im Verlauf der Erkrankung ein Risikoprofil zu erstellen, an Hand dessen frühzeitig therapeutischen Konsequenzen gezogen werden können.

Aus therapeutischer Sicht war über viele Jahrzehnte hinweg das Alkylanz Chlorambucil Mittel der Wahl. Dennoch konnte weder mit dieser Substanz alleine, noch in der Kombination mit Vincaalkaloiden eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erzielt werden. Deutlich bessere Ergebnisse konnten durch eine Kombination von Purinanaloga mit Alkylanzien erreicht werden, wie in der Studie von *Hallek et al. 2001* gezeigt werden konnte. Hier konnte eine Überlegenheit von Fludarabin/Cyclophosphamid im Hinblick auf klinisches Ansprechen, progressionsfreies Überleben und kompletter Remission gegenüber allen bis dato verfügbaren Therapieoptionen bewiesen werden (*Hallek et al. 2001, Catovsky et al. 2007, Bauduer et al. 2012*).

Aktuelle therapeutische Strategien sind darauf ausgerichtet, monoklonale Antikörper mit Standardchemotherapien zu kombinieren, um so spezifischer gegen die Tumorzellen agieren zu können. In der Therapie vieler B-NHL hat sich der Anti-CD20 Antikörper Rituximab als unverzichtbarer wirksamer Partner erwiesen. Dennoch scheint es auf den ersten Blick überraschend, genau diesen Antikörper bei der CLL einzusetzen, da, wie oben bereits erwähnt, die Expression von CD20 auf der Zelloberfläche nicht sehr hoch ist (*Keating et al. 2002*). In Phase II Studien konnten aber sowohl bei vortherapierten, als auch bei therapienaiven Patienten wirksame synergistische Effekte gezeigt werden. Diese führten 2003 zur Initiierung der CLL-8-Studie der Deutschen CLL Studiengruppe (*Hallek et al. 2010*).

Im Falle einer Fludarabin-refraktären Erkrankung war bis 2012 der monoklonale Antikörper gegen CD52, Alemtuzumab (Campath®), zugelassen. Die Zulassung beruhte unter anderem auf einer Untersuchung von *Keating*, in der gezeigt werden konnte, dass durch diesen Antikörper auch in Hochrisikokonstellationen wie der Fludarabin-refraktären CLL gute Ansprechraten (33 %) bei verträglicher Toxizität erreichbar sind (*Stilgenbauer et al. 2002, Keating et al. 2002*). Die Zulassung des Präparats wurde 2012 durch den Hersteller - aus marktstrategischen Gründen - zurückgezogen. Im Rahmen eines sogenannten Named-Patient-Use ist sie für CLL Patienten weiter verfügbar. Die neuesten Therapieansätze beruhen auf der Inhibition der Bruton's Tyrosinkinase (Ibrutinib) und der

Phosphoinositid-3-Kinase Delta (Idelalisib). Für Ibrutinib wurde bereits die FDA Zulassung erteilt, für die Idelalisib wird sie im Herbst 2014 erwartet. Durch Anwendung von Ibrutinib konnte in einem Hochrisikokollektiv nach 26 Monaten Nachbeobachtungszeit eine PFS Rate von 75 % erzielen (*Byrd et al. 2013*). In der Studie von *Furman* konnte, ebenfalls in einem Hochrisikokollektiv, die Gesamtansprechrate durch die Therapie mit Idelalisib auf 81 % im Verumarm gegenüber 13 % im Placeboarm angehoben werden (*Furman et al. 2014*).

Des Weiteren wird die allogene Stammzelltransplantation als kuratives Konzept für junge Hochrisikopatienten als grundsätzlich wichtiges Therapiekonzept angesehen und derzeit in Studien weiter geprüft (*Dreger et al. 2007*). Aktuelle Arbeiten zeigen, dass die allogene Stammzelltransplantation auch bei Patienten mit Hochrisikomerkmale (TP53-, NOTCH1- und SF3B1-Mutation) eine wirksame Therapieform ist (*Dreger et al, 2010 und 2013*). Die autologe periphere Blutstammzelltransplantation konnte bislang nur im Rahmen der Erhaltungstherapie nach Erreichen einer Komplettremission (CR) statistisch signifikante Vorteile gegenüber dem Beobachtungsarm zeigen und ist heute obsolet, da keine Überlegenheit gegenüber der konventionellen Chemoimmuntherapie gezeigt werden konnte (*Sutton et al. 2011*).

1.2 Die B-Zelle – Entwicklung und somatische Hypermutation

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die B-Zellreifung - welche die somatische Hypermutation beinhaltet - ist es gelungen, Ätiologie und Pathomechanismen der CLL, zumindest in Teilen, zu verstehen. Der Prozess der B-Zellreifung läuft in mehreren Schritten ab. Die im Verlauf detektierbaren Vorstufen der B-Zelle zeichnen sich durch unterschiedliche Oberflächenmerkmale aus. Aus der omnipotenten Knochenmarkstammzelle entwickeln sich in einem mehrstufigen, antigen-unabhängigen Prozess über Pro-B-Zelle und Prä-B-Zelle unreife B-Zellen. Im Stadium der Pro-B-Zelle findet im Rahmen der Immunglobulingenumlagerung der Schwereketten die Verknüpfung des D-Segments (D = diversity) mit der J-Region (J = joining) durch somatische Rekombination statt. Dieses verknüpfte Element wird anschließend an das V-Segment (V = variable) angehängt (VDJ-Rearrangement). Bei der Immunglobulingen-Umlagerung der Leichtkette fehlt das D-Segment, so dass es nur zu einem V-J-Rearrangement kommt, dieser Schritt findet während der Prä-B-Phase statt. Die im Anschluss daran stattfindende

Umlagerung des Ig-Leichtkettengens führt dazu, dass die unreife B-Zelle komplette, membranständige B-Zellrezeptormoleküle vom Typ IgM exprimiert. Die reife B-Zelle kennzeichnet sich schließlich durch die Präsentation von sowohl IgM als auch IgD Rezeptoren auf der Zelloberfläche, diese werden durch alternatives Spleißen generiert. Ein wichtiges Merkmal einer funktionierenden Immunantwort ist die Aussortierung autoreaktiver B-Zellen. Dies geschieht ebenfalls im Stadium der unreifen B-Zelle, also noch bevor die B-Zelle das Knochenmark verlässt. Die im Blut zirkulierenden naiven reifen B-Zellen können fremde Antigene binden. Werden sie dabei durch CD4⁺ T-Helfer-Zellen kostimulatorisch aktiviert, wandern sie in die Keimzentren der Lymphknoten und der Milz. Hier erfolgt im Rahmen der Keimzentrumsreaktion eine Antikörperreifung. Die Generierung der Spezifität geschieht durch die somatische Hypermutation. Im Prozess der somatischen Hypermutation erlangt die Zelle zunehmende Affinität durch überdurchschnittlich häufiges Einstreuen von Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Duplikationen in die variablen Regionen des Leicht- und Schwerekettengens. Diese können entweder stumme Mutationen sein, ohne das aus der Sequenz generierte Protein zu verändern, oder zum Austausch von Aminosäuren und somit zur Entstehung eines anderen Proteins führen, oder bei zufälliger Codierung für eines der drei Stoppcodons den Abbruch der Aminosäuresequenz einleiten, ohne die Produktion eines funktionierenden Immunglobulins zu ermöglichen. Es erfolgt eine Selektion von Klonen, deren B-Zellrezeptor besser bindet. Der Prozess von Hypermutation und anschließender Selektion findet repetitiv statt. Durch Promotoren wird in diesen Bereichen die Spontanmutationsrate auf eine Häufigkeit getriggert, die ca. sechs Zehnerpotenzen über der normalen Mutationsrate in anderen Zellregionen liegt. Hier scheint insbesondere der 3' Enhancer der Schwerekette relevant Einfluss zu nehmen (*Dunnick et al. 2009*). Das Einstreuen der Mutationen selbst erfolgt initial über das Enzym Activation-induced cytidine deaminase (AID) welches Teil eines komplexen Systems von Proteinen ist (*Peled et al. 2008, Maul and Gearhart 2010, Chen et al, 2014*). Aktuelle Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung der AID über den sog. Aicda-Promotor erfolgt, der wiederum direkt durch den Transkriptionsfaktor HoxC4 stimuliert wird (*Park et al. 2009, Zan et al 2013*). Im Unterschied zu normalen Zellen sind bei Keimzentrums-B-Zellen Reparaturmechanismen, welche bei Fehlern apoptotische Vorgänge einleiten, herunterreguliert, um eine größtmögliche Vielfalt durch Mutationen innerhalb des Immunglobulingens zu erhalten (*Peled et al. 2008*).

Ein weiterer Prozess im Rahmen der Antikörperbildung stellt der Klassenwechsel (class switch) dar. Hierbei werden, ebenfalls ausgelöst durch das Enzym AID, dem variablen Teil der Schwereketten neue konstante Regionen zugeordnet, so dass sich bei erhaltener Antigen-spezifität die Effektoraktivität ändert. Einige der B-Zellen wandeln sich nicht zu antikörperproduzierenden Plasmazellen um, sondern zu B-Gedächtniszellen, um bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere Immunantwort zu generieren.

1.3 Modell zum zellulären Ursprung der CLL

Während die Genese der CLL mit mutiertem Immunglobulinschwerkettengen zunehmend geklärt scheint, ist der Pathomechanismus bei der CLL mit unmutiertem *IGHV* Status noch ungeklärt (*Seifert et al. 2012*). Unterschiedliche Hypothesen werden im Moment verfolgt. Einerseits könnte es sich um abortive autoreaktive Keimzentrums-B-Zellen handeln, welche im Rahmen der somatischen Hypermutation bei fehlendem Affinitätszugewinn nicht automatisch in Apoptose übergehen, sondern das Keimzentrum als Tumorklon verlassen. Weitere Möglichkeiten könnten eine T-Zell unabhängige antigenvermittelte Aktivierung von B-Zellen sein, welche ähnliche Eigenschaften wie Marginalzonen-B-Zellen aufweisen, oder der Ursprung aus bislang nicht näher identifizierten CD5 positiven B-Zellen. Möglicherweise liegt der CLL sogar eine frühe Tumorstammzelle zu Grunde (*Zenz et al. 2010*). Ziel aller Untersuchungen auf diesem Gebiet ist die Identifizierung neuer Strukturen, welche eine zielgerichtete Therapie der CLL ermöglichen.

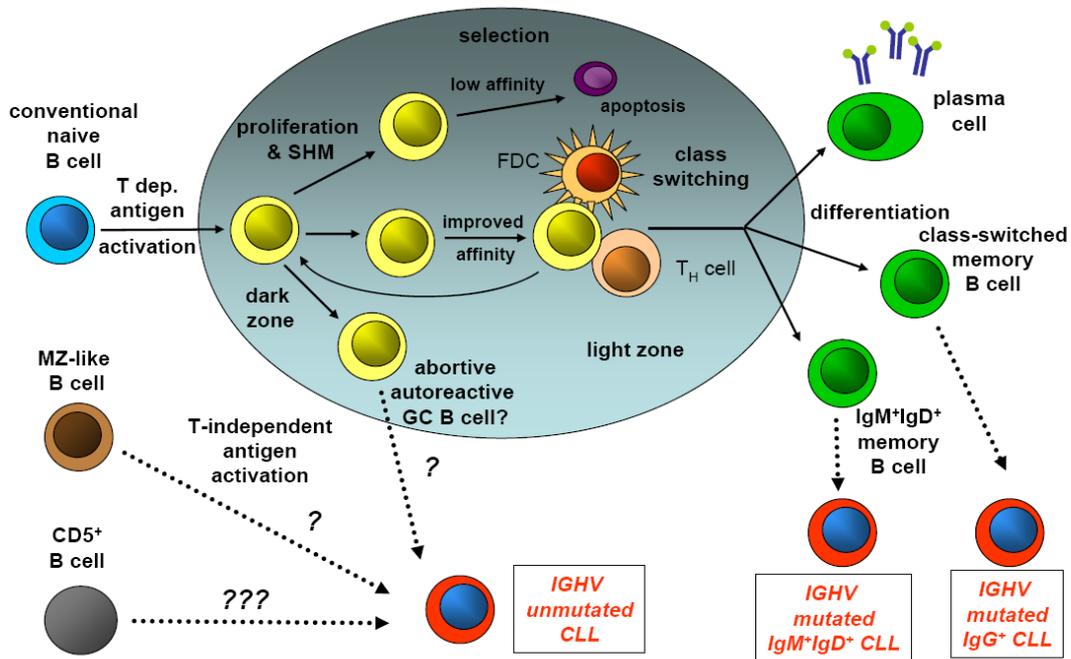


Abbildung 1:

Zenz *et al.*: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia, Nat Rev Cancer 2010. Pathogenese der CLL: unterschiedliche Wege zum malignen Klon.

CD: Cluster of Differentiation, CLL: chronische lymphatische Leukämie, *IGHV* Immunglobulinschwerkettengen, SHM: somatische Hypermutation, FDC: folliculäre dendritische Zelle, T_H-cell: T-Helfer-Zelle, MZ like: marginalzonenähnlich, GC B cell: Keimzentrums-B-Zelle.

1.4 Prognostische Faktoren der CLL

Aufgrund der großen Breite der klinischen Ausprägung von rasch progredienten bis hin zu langjährig asymptomatischen Verläufen ist es wichtig, prognostische Marker zu identifizieren, um Aussagen zum wahrscheinlichen Krankheitsverlauf machen zu können. Biologische und genetische Prognosefaktoren, wie das Knochenmarkinfiltrationsmuster (Rozman, *et al.* 1984), die Serumspiegel von β 2-Mikroglobulin (Di Giovanni *et al.* 1989) und Serumthymidinkinase (Källander *et al.* 1984) die Lymphozytenverdopplungszeit (Montserrat *et al.* 1986), zytogenetische Aberrationen (Döhner *et al.* 2000, Stilgenbauer *et al.* 2014), der *IGHV*-Mutationsstatus sowie die Expression von ZAP-70 und CD38 (Kröber *et al.* 2002, Kröber *et al.* 2006) werden evaluiert, sind aber derzeit noch keine Grundlage für eine Therapieentscheidung und werden deshalb nicht für den regelhaften klinischen Einsatz außerhalb von Studien empfohlen (Hallek *et al.* 2008, *iwCLL Guidelines*).

Ausnahme bildet die Subgruppe jener Patienten, deren CLL eine 17p-Deletion aufweist. Diese Subgruppe ist, unabhängig von allen anderen prognostischen Markern, mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (*Döhner et al. 2000, Stilgenbauer et al. 2014*). Bei diesen Patienten, die überzufällig oft eine Resistenz gegenüber Purinanaloga aufweisen, kommen therapeutische Ansätze wie Alemtuzumab (Campath[®]), in klinischen Studien die neuen Substanzen, oder, bei jüngeren Patienten, gar die allogene Blutstammzelltransplantation in Betracht. In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber Purinanaloga nicht nur durch eine Alteration von TP53 zu erklären ist und somit weitere Mechanismen zur Klärung dieses Sachverhalts untersucht werden müssen (*Zenz et al. 2009*).

Hinsichtlich des *IGHV*-Mutationsstatus lassen sich primär zwei große Gruppen abgrenzen. Die Gruppe, die das Stadium der somatischen Hypermutation durchschritten hat, und diejenige, die es nicht hat. Da Mutationen in den Reifungsprozessen der *IGHV* Gene als kontinuierliches Spektrum zu finden sind, muss zur Identifizierung der somatischen Hypermutation ein Cut-off festgelegt werden, ab welchem die Zellen als mutiert gelten. Lag dieser Wert in den Anfängen der Analysen des *IGHV*-Rearrangements bei einer Homologie von $< 0,99$, wird inzwischen eine Homologie von $< 0,98$ verwendet. Dass es sich bei den Tumorzellklonen dennoch prinzipiell um dieselben Zellen handelt, konnten Oberflächenstrukturanalysen beweisen (*Klein et al. 2001*), die bei beiden Gruppen ein Expressionsmuster ähnlich dem der Memory-B-Zellen zeigten. Das Durchschreiten der somatischen Hypermutation gilt als Indiz für eine abgeschlossene Keimzentrumsreaktion und separiert auf diese Weise reife von unreifen B-Zellen. Wie mehrere Studien belegen konnten, sind CLL-Erkrankungen mit *IGHV*-mutierten Klonen prognostisch günstiger als unmutierte und resultieren in signifikant längerem Gesamtüberleben der Patienten (*Damle et al. 1999, Hamblin et al. 1999, Kröber et al. 2002,*). Innerhalb dieser großen Gruppen gibt es aber noch mehrere Subgruppen, die in Abhängigkeit vom umgelagerten VDJ-Rearrangement Einfluss auf die Prognose haben. Insbesondere die Umlagerung des *VH3-21* Gens (*Tobin et al. 2003, Zenz et al. 2010*) bzw. des *VH3-23* zeigten eine deutlich schlechtere Prognose.

Ebenfalls konnte von mehreren internationalen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gezeigt werden, dass bestimmte *VH*-Gene (*VH1-69, VH3-07, VH4-34*) bevorzugt umgelagert werden (*Johnson et al. 1997, Rosenquist et al. 1999, Hamblin et al. 2000, Kienle et al. 2006*).

Einen ebenfalls wichtigen Stellenwert in der prognostischen Einschätzung der CLL nimmt die Tyrosinkinase ZAP-70 (zeta-associated protein of 70 kDa) ein. Durch ATP-abhängige Phosphorylierung leitet die Kinase Signalkaskaden ein (*Chen et al. 2002*), die ihrerseits über Transkriptionsfaktoren Gene aktivieren kann, welche Zytokine wie Interleukin-2 kodieren. Dieses überführt T-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und leitet somit die Proliferation ein. Die Rolle von ZAP-70 in der Pathogenese der CLL ist noch nicht vollständig geklärt. *Chen et al.* konnten die Involvierung im B-Zell-Rezeptor Signaltransduktionsweg bereits im Jahr 2002 zeigen.

Die Hypothese von *Rosenwald et al. 2001*, *Klein et al. 2001*, und *Crespo et al. 2003*, die ZAP-70 Analyse könne die aufwendigere *IGHV* Mutationsanalyse ersetzen, haben sich bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht bestätigt. Aktuelle Untersuchungen zur Bedeutung von ZAP-70 zeigten, dass, insbesondere bei Patienten deren CLL zeitgleich einen unmutierten VH-Status aufwies, mit einer erhöhten Fallzahl an autoimmun vermittelten Zytopenien einhergingen, die wiederum die Prognose der Patienten negativ beeinflussten (*Zanotti et al. 2010*).

Ein Problem bei der Analyse von ZAP-70 ist, dass das gebräuchlichste Messverfahren mittels Durchflusszytometrie bislang nicht standardisiert wurde, so dass aktuelle Ergebnisse nur schwierig mit einander zu vergleichen sind (*Wang et al. 2011*).

Unter den prognostisch relevanten genomischen Aberrationen ist die Deletion 13q die häufigste, gefolgt von der Deletion 11q, der Trisomie 12q und der Deletion 17p (*Döhner et al. 2000*). Kurze Überlebenszeiten der Patienten sind häufig assoziiert mit der del 17p (medianes Überleben 32 Monate), einer Mutation in TP53 (*Zenz et al 2010*) und der del 11q (medianes Überleben 79 Monate). Die Deletion 13q, wenn sie alleine auftritt, ist dagegen mit einer deutlich besseren Prognose von median 133 Monaten vergesellschaftet (*Döhner et al. 1997, 1999, 2000*). Vorangegangene multivariate Analysen konnten VH Status und genomische Aberrationen als unabhängige Risikofaktoren bei der chronischen lymphatischen Leukämie identifizieren (*Kröber et al. 2002, Oscier et al. 2013, Stilgenbauer et al. 2014*). Neue Auswertungen zeigen, dass diese genomischen Veränderungen nicht zu einer Beeinflussung des Proliferationsindex der CLL führen mit Ausnahme einer Koexistenz der Aberrationen 13q und 17p (*Quijano et al. 2008*).

Aktuelle Ansätze zur Identifikation prognostischer und prädiktiver Marker bei der CLL basieren auf „next generation sequencing“ Technologien die eine Reihe neuer Genmutationen, beispielsweise in Genen wie *NOTCH1* und *SF3B1* identifiziert haben (*Puente et al. 2011, Wang et al. 2011, Landau et al. 2013*). Allgemein sind diese

Mutationen mit rascher Progression und kurzen Überlebenszeiten assoziiert worden. Allerdings zeigt sich zunehmend, dass die prognostische und prädiktive Bedeutung diese Mutationen vom Therapiekonzept abhängt, das bedeutet, dass unterschiedliche Einflüsse je nach Behandlungsform entstehen (*Dreger et al. 2013, Schnaiter et al. 2013, Stilgenbauer et al. 2014*).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Untersuchung von Patientenproben aus dem gut charakterisierten Kollektiv der CLL-8 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe (DCLLSG) auf genetische Prognosefaktoren. Im Vordergrund stand dabei die explorative Analyse der Struktur und des Mutationsstatus des *IGHV*-Gens zur Generierung von Hypothesen zur Prognoseabschätzung. Darüber hinaus sollte das Vorkommen chromosomaler Aberrationen in Korrelation zur *IGHV*-Gen Struktur beurteilt werden. Durch die detaillierte Charakterisierung dieses prospektiv betrachteten Studienkollektivs, das mit der aktuellen Standardtherapie behandelt wurde, sollte es gelingen, die prognostische Wertigkeit dieser Marker im Hinblick auf progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) nach Erstlinientherapie anhand von uni- und multivariaten Analysen innerhalb entsprechender Subgruppen näher zu fassen und in die klinische Situation einzuordnen.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Proben

2.1.1 Studiendesign

Gegenstand der molekular- und zytogenetischen Diagnostik war das Patientenkollektiv der CLL-8 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe. Die CLL-8 Studie wurde als internationale, offene, multizentrische, randomisierte Phase-III-Studie konzipiert. Verglichen wurden dabei in der CLL-Erstlinientherapie die zwei Therapiemodalitäten Fludarabin/-Cyclophosphamid (FC-Arm) und Rituximab/-Fludarabin/-Cyclophosphamid (FCR-Arm). Die Rekrutierung des Patientenkollektivs erfolgte vom 21.07.2003 bis zum 04.04.2006. Eingeschlossen wurden 817 CLL-Patienten, die entweder ein Stadium Binet C, oder nach den unten aufgeführten IWCLL-Kriterien (*Hallek et al. 2008*) eine Behandlungsindikation/Therapienotwendigkeit aufwiesen.

CLL Diagnosekriterien entsprechend iwCLL Kriterien

Nachweis von > 5.000 klonalen B-Zellen/ μ l peripherem Blut

Vorherrschen kleiner, morphologisch reifer Lymphozyten im Blutausstrich

Koexpression von CD5, CD19, CD23 und CD20.

Nachweis einer Leichtkettenrestriktion

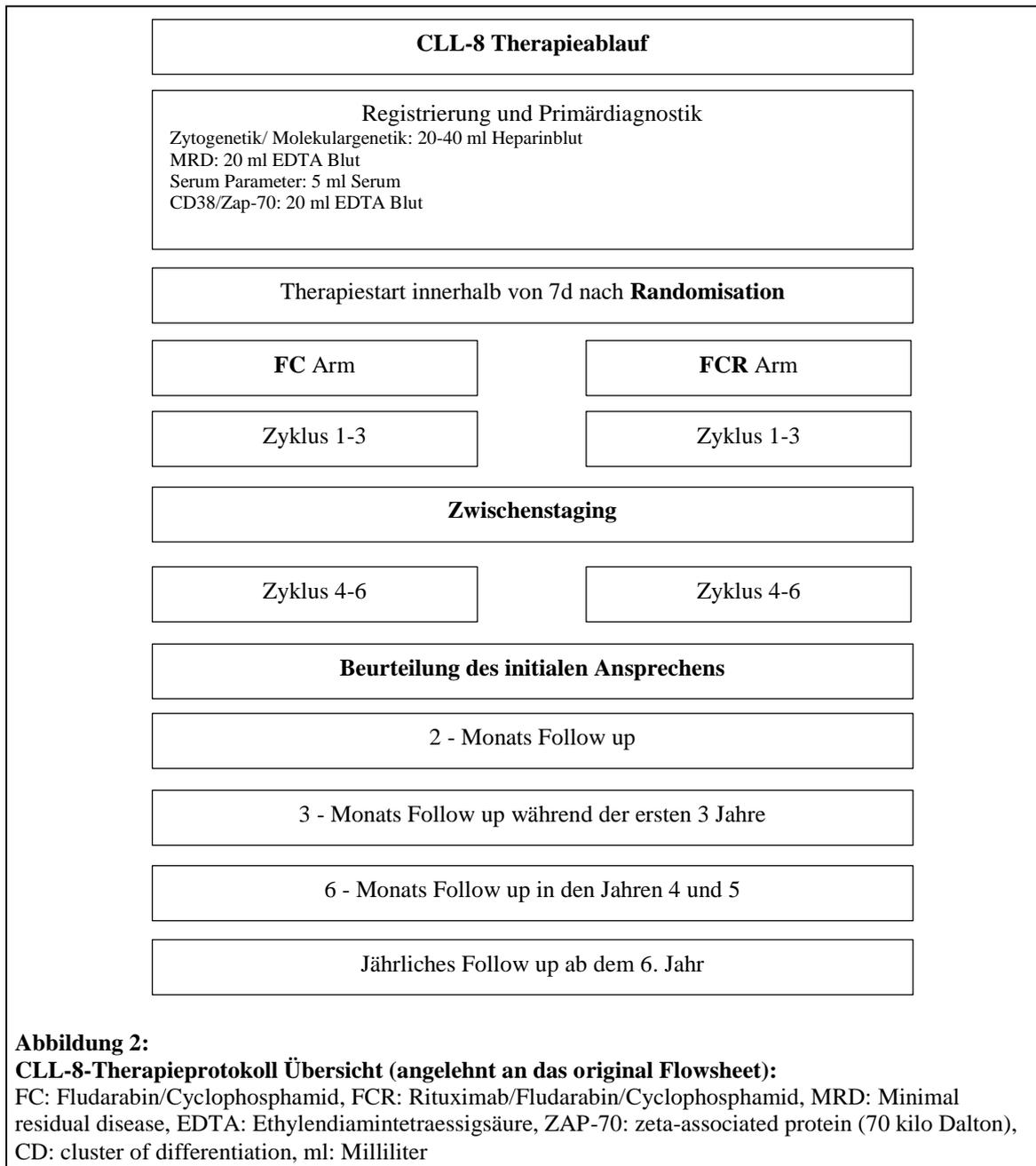
Als weiteres Einschlusskriterium wurden das Alter von mindestens 18 Jahren und eine vermutete Lebenserwartung von mindestens 6 Monaten festgelegt. Außerdem musste bei Studieneinschluss ein ECOG-performance-status von 0 oder 1 vorliegen. Patienten mit funktionellen Einschränkungen wesentlicher Organsysteme waren von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Für den Zeitraum der Therapie musste bei allen Patienten/-Patientinnen eine suffiziente Kontrazeption sichergestellt sein.

CLL-Patienten die folgende Merkmale aufwiesen waren ebenfalls von einer Studienteilnahme ausgeschlossen:

- Klinisch signifikante autoimmunvermittelte Verminderungen der Zellzahl

- Aktive Zweitmalignome, die aktuell therapiebedürftig waren (Ausnahme: Basalzellkarzinom oder Tumore, die durch alleinige Operation kurativ therapiert werden konnten)
- Schwer einstellbarer arterieller Hypertonus
- Begleiterkrankungen, welche die zeitgleiche Einnahme von Glukokortikoiden für einen Zeitraum größer als einen Monat erforderten
- Bekannte Überempfindlichkeit und anaphylaktische Reaktionen auf humanisierte monoklonale Antikörper, sowie gegen eines der Studienmedikamente
- Zerebrale Leistungsminderung, die Teilnahme an der Studie unmöglich machte
- Transformation der CLL in ein hochmalignes NHL
- Aktive bakterielle, virale oder Pilzinfektionen; insbesondere Patienten mit aktiver oder abgelaufener Hepatitis B Infektion
- Leberfunktionseinschränkung, definiert als Erhöhung der Alkalischen Phosphatase und/ oder der Lebertransaminasen auf das Doppelte des oberen Normwertes
- Erhöhung des Gesamtbilirubins auf das Doppelte des oberen Normwertes
- Nierenfunktionseinschränkung, definiert als Kreatinin-Clearance <70 ml/min (gemäß der Formel nach Cockcroft und Gault)
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Jeglicher parallel bestehender klinischer oder psychologischer Zustand, der eine Teilnahme an den von der Studie geforderten Maßnahmen unmöglich machte
- Teilnahme an weiteren klinischen Studien zu gleicher Zeit oder Einnahme eines weiteren Prüfmedikaments bis zu 30 Tagen vor Studieneinschluss

Die überwiegende Mehrzahl der zu analysierenden Proben wurden aus peripherem Blut (PB) gewonnen. Darüber hinaus diente bei einigen Knochenmark als Ausgangsmaterial. Neben dem Zeitpunkt vor Therapiestart wurden außerdem Proben im Verlauf der Erkrankung insbesondere bei Progression (Follow-up Proben) gewonnen. Zur Analyse des Mutationsstatus der variablen Schwereketten des klonal umlagerten Immunglobulin-Gens wurde ein bei -80 °C asserviertes Zellpellet verwendet. Nach Extraktion von sowohl DNA als auch RNA konnte der entsprechende Genabschnitt amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Für die Analyse des progressionsfreien Überlebens (PFS) waren für 817 Patienten klinische Daten verfügbar.



2.1.2 Materialien und Chemikalien

2.1.2.1 Geräte

Biofuge fresco
 Biofuge pico
 BioPhotometer

Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
 Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Cap Installing Tool	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
DNA Sequenzer ABI PRISM 3130xl	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Eagle eye [®] Still Video System	Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammern	MBT Brand, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gelkammer	LMS Labortechnik GmbH, Dossenheim, Deutschland
LABOPORT [®] Vacuum pump	Fa. KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Mehrkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung, 8-Kanal (0,5-10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MicroAmp Splash Free 96-Well Base	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, Deutschland
Multifuge 3 S_R Heraeus	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rührfische	VWR, Darmstadt, Deutschland
Thermal Cycler 2720 und 2700	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Transilluminator 4000	Stratagene (Agilent), Böblingen, Deutschland
Vortex Genie 2 [™]	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage 572-35	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Waage Precisa 400M	PAG Oerlikon, Pfäffikon, Schweiz

2.1.2.2 Laborbedarf

15 ml konische Röhrchen (15 ml-Falcon)	BD, Heidelberg, Deutschland
1 ml Spritzen	BD, Heidelberg, Deutschland
50 ml konische Röhrchen (50 ml-Falcon)	BD, Heidelberg, Deutschland
96 Well Plate Septa	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
96-Well-Platte ohne Deckel	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
ART Aerosol Resistant Tips, 10	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 1000 Reach	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 1000E	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 100E	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 200	Molecular Bioproducts, San Diego, USA

ART Aerosol Resistant Tips, 20P	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
Autoklavier-Klebeband mit Indikator	Meipha, Geislingen, Deutschland
Collection Plate 48-Well	Quiagen, Hilden, Deutschland
Combitips plus 1,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips plus 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips plus 5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckel für 96-Well-Mikrotestplatte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckel für Reaktionsgefäß 8er-Caps	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Einmal-Wägeschalen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kanülen, Sterican 100, 0,70x30 mm	BBraun, Melsungen, Deutschland
MicroAmp 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
MicroAmp 8-Tube Strip	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermowell 96-Well-Plate Model P	Corning Inc, Amsterdam, Niederlande
Thermowell Sealing Tape	Corning Inc, Amsterdam, Niederlande
Uvette, 220-1600 nm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2.3 Reagenzien

100 bp DNA Ladder (500 µg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
10x BlueJuice Loading Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
10x PCR-Puffer	Quiagen, Hilden, Deutschland
5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50)	Quiagen, Hilden, Deutschland
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Roche, Mannheim, Deutschland
DyeEx 2.0 Spin Kit (250)	Quiagen, Hilden, Deutschland
DyeEx 96 Kit (24)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromid 0,07 %	ApplChem, Darmstadt, Deutschland
GeneScan 500 Rox Size Standard	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase 1000 units	Quiagen, Hilden, Deutschland
Primer 100 µM	Biospring, Frankfurt a. M., Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Quiagen, Hilden, Deutschland
TrackIt 100 bp Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
TRIS EDTA Buffer Solution pH 7,4	Fluka, Basel, Schweiz
UltraPure™ DEPC-Treated Water	Invitrogen, Carlsbad, USA
β-Mercaptoethanol, Molecular Biology Grade	Gibco, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 DNA/RNA Präparation

Die für die Analysen verwendeten Zellfraktionen werden aus ca. 20 ml Patienten-Vollblut gewonnen, welches das Antikoagulanzen NH₄Heparin enthält. Die mononukleäre Zellfraktion wird mittels Ficoll Dichtegradient-Zentrifugation extrahiert und bei -80 °C asserviert. Für ein optimales Ergebnis sollen diese Pellets jeweils nicht mehr als 1×10^7 Zellen enthalten. Die Extraktion von DNA und RNA erfolgt mittels AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Quiagen®) analog dem Standardprotokoll des Herstellers. Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Isolate werden mittels Photometrie quantifiziert und zu Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 200 ng/µl verdünnt. Die RNA-Isolate werden unverdünnt bei -80 °C aufbewahrt und bei Bedarf in amplifizierbare cDNA umgeschrieben. Eine qualitative Analyse von DNA und RNA erfolgt mittels Elektrophorese über ein Agarosegel.

2.2.2 Herstellung von cDNA

Vor der Umschreibung der RNA in cDNA muss die RNA mit 100 % Ethanol und 3 M NaCl gefällt werden. Nach Eliminierung eventueller DNA Rückstände durch DNase (Roche) kann die RNA in cDNA revers transkribiert werden. Die Reagenzien werden für 30 min bei 42 °C inkubiert und anschließend zur Terminierung der Reaktion für 5 min auf

95 °C erhitzt. Die so erzeugte cDNA ist umgehend auf Eis zu kühlen. Die Umschreibung von RNA in cDNA ist in allen Fällen notwendig, in denen auf DNA-Basis nach der Sequenzierung mehrere Klone mit produktiver CDR-3 Region auftreten. Die Sequenzierung erfolgt in diesen Fällen dann mit cDNA.

Tabelle 1:

Mastermix für die Umschreibung von 1 µg RNA in cDNA. MgCl₂: Magnesiumchlorid. PCR: Polymerasekettenreaktion. dNTP: Desoxyribonukleotidtriphosphate. A: Adenin. T: Thymin. G: Guanin. C: Cytosin. DEPC-H₂O: mit Diethylen Pyrocarbonat behandeltes Wasser. µl: Mikroliter.

MgCl ₂	3 µl
10x PCR Puffer	1,25 µl
Random Hexamers	0,5 µl
dNTP A, T, G, C	je 1 µl
RNAse Inhibitor	0,5 µl
Moloney murine leukemia virus reverse Transkriptase	0,5 µl
DEPC- H ₂ O	5,25 µl

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Ablauf und Reaktionsprinzip der PCR

Die 1983 von KARY MULLIS erstbeschriebene Polymerasekettenreaktion stellt heutzutage die grundlegende Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA-Abschnitte dar. Sie beruht auf einem dreischrittigem Reaktionsmechanismus, dieser wird je nach Bedarf des Anwenders unterschiedlich oft wiederholt. Schlüssel zur erfolgreichen Reaktion ist die Verwendung einer thermostabilen Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Die Polymerase entfaltet ihre größte Leistung bei einer Temperatur von 72 °C, was die natürlichen Reaktionszeiten erheblich verkürzt. Weitere Bestandteile der Reaktion sind eine Pufferlösung, die Desoxyribonukleotidtriphosphate Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, spezifische Oligonukleotidprimer und Wasser. Je nach Länge und Zusammensetzung des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und der spezifischen Oligonukleotidprimer werden unterschiedliche Zeiten und Temperaturen gewählt. Die Primer sind so auszuwählen, dass sie dem DNA-Strang am 5' bzw. 3' Ende komplementär

sind. Für die Amplifizierung der variablen Schwereketten des Immunglobulins (VDJ-Schwereketten) eignen sich folgende Temperaturen:

1. Schritt: Denaturierung und Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs bei 95 °C.
2. Schritt: Hybridisierung der Primer mit dem DNA-Einzelstrang (Annealing) bei 65 °C.
3. Schritt: Synthesephase. Bei 72 °C synthetisiert die thermostabile Polymerase (HotStarTaq[®], Fa. Quiagen) den zwischen dem Primerpaar liegenden DNA-Abschnitt.

Abschließend, das heißt nach dem Durchlaufen aller PCR-Zyklen, wird das Reaktionsprodukt zur Extension für 10 min auf 72 °C gehalten.

Die PCR-Maschine für alle in dieser Arbeit beschriebenen Reaktionen ist der Thermocycler der Fa. Applied Biosystems.

2.2.3.2 Primerdesign

Das Primerdesign richtet sich nach den genomischen Gegebenheiten des VDJ Rearrangements. Insgesamt existieren sechs verschiedene *IGHV*-Familien, dementsprechend müssen sechs verschiedene 5' VH-Primer gewählt werden. Bindungsstelle dieser Primer ist die Framework-1-Region des Immunglobulinschwerkettengens. Eine Markierung dieser Primer mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM[™], NED[™] und HEX ermöglicht eine simultane Multiplex-PCR mit anschließendem GeneScan[®] zur Identifizierung der unterschiedlichen *IGHV*-Familien. Hierzu werden die *IGHV*-Familien *VH1*, *VH3* und *VH4* sowie *VH2*, *VH5* und *VH6* gruppiert und in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert und analysiert. Alternativ können Primer verwendet werden, die im Gegensatz zu den oben beschriebenen nicht an der Framework-I Region, sondern bereits in der Leader-Region des Genabschnitts binden. Diese Primer werden als 5'VH-Leaderregion-Primer bezeichnet. Der Nachteil dieser Primer ist allerdings, dass sie nicht in allen Fällen ein verwertbares Amplifikat bilden. Deshalb werden sowohl Framework-, als auch Leaderregion-Primer verwendet.

Der 3'JH-Primer muss so gestaltet sein, dass er in der Joining-Region des VDJ-Rearrangements bindet. Auch hier existieren, wie auch bei der VH-Region, mehrere verschiedene JH-Familien. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zwischen den JH-Familien 1, 2, 4 und 5 wird hier ein Konsensusprimer verwendet. Die JH-Familien 3 und 6 werden mit

separaten Oligonukleotidprimern amplifiziert. Die 3'JH-Primer können in den meisten Fällen der Reaktion als Mix beigegeben werden, nur in Ausnahmefällen muss eine spezielle PCR mit den einzelnen 3'JH-Primern durchgeführt werden.

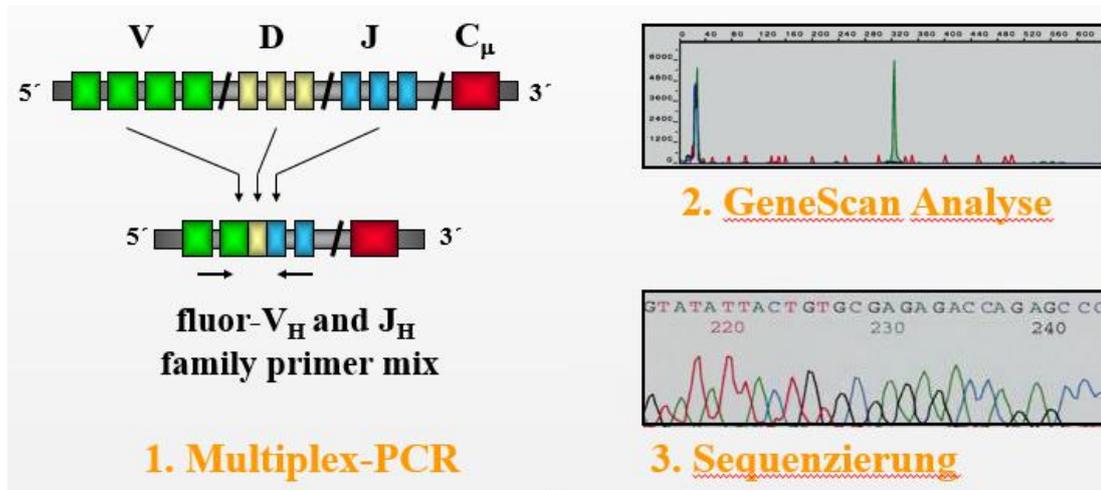


Abbildung 3:

Darstellung des Untersuchungsablaufs. Schematische Darstellung des Immunglobulin-schwerkettengens mit den Segmenten V (variable), D (diversity), J (joining) und C (constant). PCR: Polymerasekettenreaktion. A,T,G,C: Nukleotide Adenin, Tymidin, Guanin und Cytosin. (nach Kröber *et al.* 2002)

Nukleotidsequenzen der eingesetzten PCR-Primer

Biospring-Primer

VH1	5'-cct cag tga agg tyt cct gca agg c-3'	FAM
VH2	5'-gtc ctg cgc tgg tga aac cca cac a-3'	FAM
VH3	5'-ggg gtc cct gag act ctc ctg tgc ag-3'	NED
VH4	5'-gac cct gtc cct cac ctg crc tgt c-3'	HEX
VH5	5'-aaa aag ccc ggg gag tct ctg arg a-3'	HEX
VH6	5'-acc tgt gcc atc tcc ggg gac agt g-3'	NED
JH1,2,4,5	5'-acc tga gga gac ggt gac cag ggt-3'	
JH3	5'-tac ctg aag aga cgg tga cca ttg t-3'	
JH6	5'-acc tga gga gac ggt gac cgt ggt-3'	
JH1 famspez.	5'-cag ggt gcc ctg gcc cca gtg c-3'	NED
JH2 famspez.	5'-cag ggt gcc acg gcc cca gag a-3'	NED
JH3 famspez.	5'-att gtc cct tgg ccc cag aca tca-3'	HEX
JH4 famspez.	5'-cac ggt tcc ttg gcc cca gta g-3'	FAM
JH5 famspez.	5'-gtg acc agg gtt cct tgg ccc cag g-3'	HEX
JH6 famspez.	5'-gtg gtc cct tgc ccc cag acg tcc-3'	FAM
CHA	5'-gag gct cag cgg gaa gac ctt-3'	HEX
CHG	5'-ggg gaa gta gtc ctt gac cag-3'	NED
CHM	5'-cag gag aaa gtg atg gag tcg-3'	FAM
VHL1	5'-atg gac tgg acc tgg agg-3'	
VHL2	5'-cac rct cct gct gct gac ca-3'	
VHL3a	5'-gct ggg ttt tcc ttg ttg c-3'	
VHL3b	5'-atg gag ttk ggr ctg agc tg-3'	
VHL4dr	5'-atg aaa cac ctg tgg ttc tt-3'	
VHL5	5'-ctc ctc ctg gct gtt ctc c-3'	
VHL6	5'-ctg tct cct tcc tca tct tcc-3'	
LaminB1 for	5'-att gcc cag ttg gaa gcc t-3'	
LaminB1 rev	5'-tgg tct cgt taa tct cct ctt cat ac-3'	

Biomed-Primer:

FR1c	5´ -agg tgc agc tgs wgs agt cdg g-3´
JHb	5´ -ctt acc tga gga gac ggt gac c-3´
VH1B	5´ -cag gtg cag ctg gtg cag tct g-3´
VH2B	5´ -cag gtc aac ctg cag gag tct g-3´
VH3B	5´ -gag gtg cag ctg gtg gag tct g-3´
VH4B	5´ -cag gtg cag ctg cag gag tcg g-3´
VH5B	5´ -gag gtg cag ctg ctg cag tct g-3´
VH6B	5´ -cag gta cag ctg cag cag tca g-3´

Alle Primer werden in lyophilisierter Form geliefert und auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Hersteller der Oligonukleotidprimer sind die Firmen Biomed und Biospring.

2.2.3.3 Multiplex-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern

Zur Durchführung der Multiplex-PCR ist es notwendig, pro Patient zwei Ansätze zu pipettieren. Beide Ansätze enthalten 10 x PCR Puffer, Desoxyribonukleotidtriphosphate, HotStarTaq® DNA Polymerase, die Reversprimer JH3, JH6 und JH1,2,4,5 in äquimolarer Mischung und destilliertes Wasser. Bezüglich der eingesetzten Forwardprimer gibt es folgende Unterschiede: Ansatz 1 enthält einen Primermix bestehend aus VH1, 3 und 4, Ansatz 2 bestehend aus VH2, 5 und 6. Die allesamt in der Framework-1 Region bindenden Primer sind wie folgt markiert: VH1+2: FAM™, VH3+6 NED™ und VH4+5: HEX.

Durch die Mitführung einer Negativkontrolle können Verunreinigungen durch fremde DNA Partikel erkannt werden. Als Template (Patientenprobe) werden pro Reaktion 2 µl DNA verwendet, was bei einer Konzentration von 200 ng/µl einer Absolutmenge von 400 ng entspricht.

Durch dieses Verfahren kann die Anzahl der zu pipettierenden Ansätze von 6 auf 2 pro Patient verringert werden. Das sich der PCR anschließende Detektionsverfahren wird in Kapitel 2.2.9 erläutert.

Tabelle 2:

Pipettierschema der VH-Framework-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern. PCR: Polymerasekettenreaktion. dNTP: Desoxyribonucleotidtriphosphate. A: Adenin. T: Thymin. G: Guanin. C: Cytosin. H₂O dest.: destilliertes Wasser. μM : mikromolar. μl : Mikroliter. ng: Nanogramm. HotStarTaq: Polymerase aus *Thermus aquaticus*. VH-1,3,4 bzw. VH-2,5,6-Mix: Primermix mit Angriffspunkt an der Framework-Region der variablen Region des Immunglobulinschwerkettengens. JH-Mix: Primermix mit Angriffspunkt an der Joining-Region des Immunglobulinschwerkettengens.

	VH-Familie 1,3,4	VH-1,3,4 Negativkontrolle	VH-Familie 2,5,6	VH-2,5,6 Negativkontrolle
10x PCR Puffer	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
dNTP (A, T, G, C)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl
V _H -1,3,4-Mix 10 μM	1 μl	1 μl	---	---
V _H -2,5,6-Mix 10 μM	---	---	1 μl	1 μl
J _H -Mix 10 μM	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
HotStarTaq® Polymerase	0,25 μl	0,25 μl	0,25 μl	0,25 μl
H ₂ O dest.	40 μl	40 μl	40 μl	40 μl
Template [200 ng/ μl]	2 μl	---	2 μl	---

Tabelle 3:

PCR-Protokoll der VH-Framework-PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern. PCR: Polymerasekettenreaktion VH: Variable region des Immunglobulinschwerkettengens. °C: Grad Celsius. min: Minuten. sek: Sekunden. Grau hinterlegt sind die Bestandteile eines PCR-Zyklus.

Aktivierung	95 °C	15 min	35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	45 sek	
Annealing	65 °C	1 min	
Synthese	72 °C	1 min 30 sek	
Extension	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

2.2.3.4 PCR mit Leaderregion-Primern

Um die Sequenz ab Codon 1 zu erfassen bedarf es Primer vom Leaderregion-Typ. Hiermit lassen sich die Ergebnisse der Framework-1 PCR auch verifizieren. Da die *IGHV*-Familie aus der GeneScan®-Analyse bekannt ist, kann ein familienzuspezifisches Primerpaar, bestehend aus 5'-VHL_{spez}- Forwardprimer und dem 3'-JH-Mix als Reverseprimer verwendet werden.

Tabelle 4:

Pipettierschema der VH-Leaderregion-PCR. PCR: Polymerasekettenreaktion. dNTP: Desoxyribonucleotidtriphosphate. A: Adenin. T: Thymin. G: Guanin. C: Cytosin. H₂Odest.: destilliertes Wasser. μM : mikromolar. μl : Mikroliter. ng: Nanogramm. HotStarTaq: Polymerase aus *Thermus aquaticus*. VHL1,2,3a,3b,4-1dr,5,6: Primer mit Angriffspunkt an der Leaderregion der variablen Region des Immunglobulinschwerkettengens. JH-Mix: Primermix mit Angriffspunkt an der Joining-Region des Immunglobulinschwerkettengens.

	Patient	VHL Negativkontrolle
10x PCR Puffer	5 μl	5 μl
dNTP (A, T, G, C)	0,5 μl	0,5 μl
VHL familienspezifisch (1,2,3a,3b,4-1dr,5,6) 10 μM	1 μl	1 μl
JH-Mix 10 μM	1 μl	1 μl
HotStarTaq® Polymerase	0,25 μl	0,25 μl
H ₂ Odest.	40 μl	40 μl
Template [200 ng/ μl]	2 μl	---

Tabelle 5:

PCR-Protokoll der VH-Leaderregion-PCR. PCR: Polymerasekettenreaktion VH: Variable Region des Immunglobulinschwerkettengens. °C: Grad Celsius. min: Minuten. sek: Sekunden. Grau hinterlegt sind die Bestandteile eines PCR- Zyklus.

Aktivierung	95 °C	15 min	38 Zyklen
Denaturierung	95 °C	45 sek	
Annealing	60 °C	1 min	
Synthese	72 °C	1 min 30 sek	
Extension	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

2.2.4 Qualitative Analyse amplifizierter DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit diesem Verfahren ist es möglich, DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufzutrennen und durch Einfärbung mit Ethidiumbromid im ultravioletten Licht sichtbar zu machen. Ethidiumbromid interkaliert mit den amplifizierten DNA- Fragmenten und stellt diese als Bande dar. Hierzu wird ein 1,5 %iges Agarosegel gegossen und an ein Gleichstromfeld mit einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 500 mA für die Dauer von 30 min angeschlossen. Als Pufferlösung dient 1xTAE. In die Taschen des Gels werden 10 μl des PCR-Produkts und 2 μl BlueJuice-Gel-Loading-Buffer pipettiert. Anhand eines mitlaufenden Längenstandards (1 kb DNA Ladder, Fa. Invitrogen) kann die Größe der Fragmente abgeschätzt und somit eine Identifizierung erfolgen. Nach Ablauf der

30 min kann das Gel mit Hilfe des EagleEye®-Systems abfotografiert werden. Liegt bei negativem Leerwert eine positive Bande beim PCR-Produkt vor, wird dieses der GeneScan®-Analyse unterzogen. Analog dieser Methode wird das Ergebnis der DNA/RNA-Preparation (AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Quiagen®) überprüft. Anstatt 10 µl werden hier 5 µl Template und 5 µl H₂O dest. verwendet.

2.2.5 GeneScan® Analyse

Die Patientenproben zur GeneScan®-Analyse wurden mit dem AbiPrism®- DNA-Sequenzer 3130xl bearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen 16-fach Kapillarsequenzer. Bei diesem Verfahren wird die Probe mit einer Kanüle angesaugt und durch eine Kapillare geleitet. Diese Kapillare liegt im Strahl eines Argonionenlasers, der die bei diesem Verfahren mit den Farbstoffen FAM™, NED™ und HEX fluoreszenzmarkierten DNA-Amplifikate zum Leuchten anregt. Das emittierte Signal wird von einer CCD-Kamera erfasst und mittels Software in einen farbigen Peak verwandelt. Mit diesem Verfahren können die PCR-Produkte sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert und mehrere PCR-Produkte unterschieden werden.

Die GeneScan®-Analyse ist entsprechend dem Standardprotokoll von Applied Biosystems durchzuführen. Von jeder Probe werden 0,5 µl entnommen und 9,25 µl Formamide sowie 0,25 µl GeneScan-500 ROX™-Size Standard hinzugegeben und in eine 96-Well MicroAmp Platte der Firma Applied Biosystems pipettiert. Sollte innerhalb eines 16er Blocks eine Vertiefung frei bleiben, so muss diese mit 20 µl H₂O dest. aufgefüllt werden. Anschließend muss die Platte mit einer sogenannten Plate Septa 96 Well von Applied Biosystems abgedeckt werden. Danach wird die gesamte Platte für 3 min zur Denaturierung der PCR-Produkte auf 95 °C erhitzt. Der Sequenzer muss wie folgt programmiert werden:

Sample Typ:	„Sample“,
Size Standard:	„GS500“,
Panel:	„None“,
Analysis Method:	„Microsatellite Default“,
Results Group 1:	„GeneScan_VH_50cm“,
Instrument Protocol:	„GeneScan_VH_50cm“.

Die fertige Platte kann nun an der richtigen Stelle des Geräts positioniert werden und der GeneScan gestartet werden.

Auswertung der GeneScan®-Analyse

Die Zuordnung von Farbstoff und *IGHV*-Familie erfolgt nach folgendem Schema: Der blaue Peak entspricht den *IGHV*-Familien *VH1/7* bzw. *VH2*, der schwarze Peak den *V_H*-Familien *VH3* bzw. *VH6* und der grüne Peak den *IGHV*-Familien *VH4* bzw. *VH5*. Der mitgeführte Längenstandard dient zur Kontrolle der Fragmentgröße der amplifizierten DNA-Abschnitte. Für die PCR-Produkte mit eindeutigem GeneScan® Ergebnis wird nach einem Aufreinigungsschritt die Sequenzreaktion gestartet.

In allen anderen Fällen müssen neue PCR-Ansätze mit jeweils nur einem Primerpaar pipettiert werden. Die Auswertung erfolgt in diesen Fällen dann nicht mit der GeneScan® Methode, sondern an Hand des Agarosegels.

2.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur weiteren Verarbeitung müssen die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Dieser Schritt wird mit dem QIAquick®-8-PCR-Purification-Kit gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein spezielles, in eine Membran eingebettetes Silikat mit selektiven Bindungseigenschaften ist die Grundlage dieses Aufreinigungsschrittes. Während der Reaktionsansatz mittels eines durch eine Vakuumpumpe (QIAvac®) erzeugten Unterdrucks von ca. -300 mbar durch die Membran gezogen wird, bleibt das PCR-Produkt aufgrund seiner Adsorptionsfähigkeit an der Membran haften. Nichtverbrauchte Oligonukleotidprimer oder Verunreinigungen werden an der Membran nicht adsorbiert und können verworfen werden. Anschließend wird die Membran zweimal mit einem ethanolhaltigen PE-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift entfernt Salze aus der

Membran, ohne die amplifizierte DNA aus der Membran herauszulösen. Zum Abschluss wird auf die Membran 75 µl Elution Buffer (EB) pipettiert. Unter Sog (-400 mbar) wird das PCR-Produkt nun aus der Membran eluiert und in 200-µl-Tubes aufgefangen. Die Lagerung der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgt bei 4 °C.

2.2.7 Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion wird nach dem Prinzip nach SANGER durchgeführt. Das Prinzip entspricht einer Kettenabbruchreaktion, bei der Kopien unterschiedlicher Länge synthetisiert werden. Hierzu wird der zu dem PCR-Produkt passende familien-spezifische VH-Primer dem PCR-Ansatz zugegeben. Eine DNA-Polymerase (Ampli-Taq[®]-DNA-Polymerase) synthetisiert daraufhin die komplementären DNA-Stränge. Im Gegensatz zur normalen Polymerasekettenreaktion werden hier mit fluoreszierenden Farben markierte ddNTPs verwendet, welchen die zur Kettenverlängerung notwendige 3'-OH Gruppe fehlt, so dass keine Phosphodiesterbrücken gebildet werden können. Die DNA-Polymerase verbaut diese ddNTPs in zufälliger Reihenfolge. Sobald ein ddNTP eingebaut wird kommt es sofort zum Kettenabbruch. Die entstehenden DNA-Fragmente unterscheiden sich in der Länge genau um eine Base. Der für diese Reaktion benötigte BigDye[®]-Ready-Reaction-Mix enthält bereits die fluoreszenzmarkierten ddNTP's (dye-terminators), die nichtmarkierten dNTP's und die DNA-Polymerase (Ampli-Taq[®]-DNA-Polymerase). Die eigentliche Reaktion erfolgt nach dem gleichen Schema wie bei der normalen PCR: Denaturierung, Primerannealing und Synthesephase kennzeichnen den dreischrigen Zyklus. Für ein ideales Ergebnis mit einer ausreichenden Menge an markierten DNA-Fragmenten benötigt man 25 PCR-Zyklen.

Tabelle 6:

Pipettierschema der Kettenabbruchreaktion. BigDye[®] ReadyReaction Mix, bestehend aus fluoreszenzmarkierten Desoxydinukleotiden, unmarkierten Desoxydinukleotiden, Ampli-Taq[®] DNA Polymerase. µl: Mikroliter. µM: mikromolar. H₂Odest.: destilliertes Wasser. PCR: Polymerasekettenreaktion. Buffer 5x: Sequencing Buffer der Fa. Applied Biosystems.

BigDye [®] Ready Reaction Mix	4 µl
Primer [1 µM]	4 µl
Puffer 5x	2 µl
H ₂ Odest.	3,5 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	1,5 µl

Tabelle 7:

PCR-Protokoll der Kettenabbruchreaktion. PCR: Polymerasekettenreaktion. °C: Grad Celsius. min: Minuten. sek: Sekunden. Grau hinterlegt sind die Bestandteile eines PCR-Zyklus.

Aktivierung	96 °C	10 min	25 Zyklen
Denaturierung	96 °C	10 sek	
Annealing	52 °C	5 sek	
Synthese	60 °C	2 min	
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

2.2.8 Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte mit DyeEx[®]-Spin Kit

Die Aufreinigung der zu sequenzierenden Produkte ist nötig, um die bei der Sequenzreaktion nicht benötigten Stoppnukleotide (ddNTP's) aus dem Reaktionsprodukt zu entfernen. Hierzu verwendet man den DyeEx[®]-Spin Kit der Firma Quiagen analog des Herstellerprotokolls. Die Aufreinigung erfolgt nach dem Prinzip der Gel-Chromatographie. In einer Säule, durch die das Reaktionsprodukt geleitet wird, befindet sich ein spezielles Polymer, welches die Eigenschaft hat, diese unerwünschten überschüssigen Stoppnukleotide der BigDye[®]-Lösung zurückzuhalten. Diese Chromatographiesäulen sind sowohl einzeln als auch als 96-Well-Platte erhältlich. Um die Polymermatrix der Säulen funktionsfähig zu halten, werden sie durchtränkt mit einer speziellen Trägerlösung geliefert. Diese muss jedoch vor Hinzugabe der Probe durch zentrifugieren entfernt werden. Anschließend wird der gesamte Reaktionsansatz über die Säule in eine 96-Well-Titerplatte abzentrifugiert. Danach wird das Eluat aus der Costarplatte in eine 96-Well-Platte der Firma Applied Biosystems überführt. Aus technischen Gründen dürfen innerhalb eines 16er Blocks keine leeren Vertiefungen sein. Deshalb müssen nicht benötigte Vertiefungen mit 20 µl destilliertem Wasser aufgefüllt werden. Die 96-Well-Platte wird mit einer Plate Septa 96 Well von Applied Biosystems abgedeckt.

2.2.9 Sequenzanalyse mittels AbiPrism DNA Sequenzer 3130xl

Die Sequenzierung erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie oben bereits bei der GenScan[®]-Analyse: die markierten ddNTP's werden mittels des Argonionenlasers zum Leuchten

angeregt, das emittierte Licht mit der CCD-Kamera erfasst. Die richtigen Einstellungen des Geräts zur Analyse der Sequenz lauten:

Results Group:	„Installation Service“
Instrument Protocol:	„BigDye 1.1_50cm_Standard“
Analysis Protocol:	„BigDye 1.1_Standard“

Vor der Analyse muss noch eine kurzzeitige Denaturierung der PCR-Produkte bei 95 °C erfolgen. Bevor der Prozess gestartet wird, muss die zu sequenzierende Platte noch dem passenden Samplesheet zugeordnet werden.

2.2.10 Auswertung der Sequenzen

Durch Umwandlung der mit der CCD-Kamera detektierten Lichtsignale in Falschfarbensignale wird die Basenabfolge ablesbar und als Textdatei und Elektropherogramm dargestellt. Per Abgleich der Sequenzen mit den bisher in der Literatur beschriebenen Keimbahn-*VH*-Genen wird das nächstverwandte Gen und eventuelle Basenabweichungen bestimmt. Diese *VH*-Datenbanken inklusive der speziellen Auswertungssoftware sind im Internet frei verfügbar (JoinSolver: <http://joinsolver.niams.nih.gov/>, IMGT: <http://imgt.cines.fr/>, NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Entscheidend für die Analyse der Sequenzen ist die Anzahl der Basenabweichungen. In der Regel handelt es sich bei den Basenabweichungen um Punktmutationen. Dennoch kann man innerhalb der Sequenzen auch andere Phänomene wie Deletionen, Insertionen und Duplikationen finden. Der prozentuale Wert der -Homologie errechnet sich aus dem Verhältnis von mutierten Nukleotiden zu der Gesamtanzahl der Nukleotide des nächstverwandten Keimbahngens multipliziert mit 100. Als Cut-Off zwischen einer Sequenz, die als mutiert angesehen wird und einer, die als unmutiert gilt, wird ein Homologiewert von < 98 % definiert. Unabhängig von der Anzahl beteiligter Nukleotide werden Deletionen, Insertionen und Duplikationen als eine Mutation gewertet. Ebenso werden die Bereiche CDR1, CDR2 und CDR3 sowie die Frameworkregionen bestimmt. Um etwaige Lesefehler der Taq-Polymerase oder Verwechslungen bei den Patientenproben auszuschließen, wird von jedem Patienten eine zweite Analyse durchgeführt. Diese Verifizierung kann dann von vornherein mit familienspezifischen *VH*- Primern durchgeführt werden. Eine zweite GeneScan®-Analyse entfällt.

Bestimmung der V-, D- und J-Segmente

Vor der Analyse der Sequenzen müssen diese auf Detektionsfehler der CCD-Kamera untersucht und gegebenenfalls manuell korrigiert werden. Diese korrigierten Versionen werden dann in die Analysesoftware eingelesen. Bei der Analyse der Sequenz wird diese nach der *IGHV*-Familie und dem nächstliegenden Keimbahngen benannt. „*VH1-69*“ bedeutet demnach zugehörig zur *VH*- Familie 1 und Keimbahngen Bezeichnung Nr. 69. Zur Orientierung auf dem Sequenzausdruck werden zu Beginn die ersten Codons des Vorwärts- und des Reverseprimers gesucht und markiert. Die Frameworkprimer starten bei Codon 25, die Leaderregionprimer ungefähr 35 Basenpaare vor Codon 1. Der JH-Reverseprimer startet immer bei Codon 102. Anschließend wird die Sequenz in die verschiedenen Regionen unterteilt. Die CDR Regionen werden farblich abgehoben. Anhand des Vergleichskeimbahngens der *VH*-Datenbanken wird die Sequenz auf Mutationen untersucht. Mittels einer Codesonne, einer Übersicht zur Dekodierung von Basentriplets im menschlichen Genom, werden die Mutationen in zwei Gruppen unterteilt: jene Mutationen, die zum Austausch einer Aminosäure führen (Replacement-Mutation = R), und jene, die sich nicht im Austausch einer Aminosäure niederschlagen (Silent-Mutation = S). In Bezug auf die Analyse des Homologiestatus spielt die Art der Mutation jedoch keine Rolle. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass Insertionen, Deletionen und Duplikationen der Sequenz als ein Mutationsereignis gewertet werden müssen. Sollte sich während der Analyse herausstellen, dass es sich bei dem nächstverwandten Keimbahngen um ein Pseudogen handelt, wird, sofern es sich um ein produktives Rearrangement handelt, welches um nicht mehr als zwei Basen von der Originalsequenz abweicht, das nächstverwandte Keimbahngen als korrektes Gen angesehen.

Die Analyse der sehr vielfältig ausfallenden Gruppe der D-Segmente erfolgt auch anhand der Analysesoftware von JoinSolver. Voraussetzung für ein „gültiges“ D-Segment ist eine Länge > 5 bp und keine Überschneidung desselben mit der Joining-Region der Sequenz. Sollte auf diese Weise kein D zu identifizieren sein, wird dieser Sequenzabschnitt in die IgBlast Datenbank eingelesen. Dennoch gibt es trotzdem immer wieder Fälle, bei denen kein D-Segment nachweisbar ist. Die Bestimmung des D-Segments mit spezieller Alignsoftware nach Wilbur-Lipman und Martinez-Needleman ist obiger Methode nicht überlegen und deswegen in dieser Arbeit nur teilweise angewendet worden. Bei dieser Art der Analyse wird die Sequenz von Beginn der CDR-3 Region bis hin zum Beginn der Joining-Region in die Align-Software eingelesen und mit den ca. 30 bekannten D-

Segmenten verglichen. Abweichungen zu diesen bekannten D-Segmenten sind nach den Kriterien von Corbett zulässig. Kann ein D-Segment gefunden werden, ist noch eine Einteilung nach der Länge in „short“-D-Segment und „long“-D-Segment vorzunehmen. Die D-Familien D1, D4, D5 und D6 werden als „short“ bezeichnet, D2 und D3 als „long“. Die Joining-Region wird ebenfalls durch Vergleich mit dem entsprechenden Keimbahnenabschnitt der Datenbanken durchgeführt. Um Fehler zu vermeiden, werden alle JH-Segmente von Hand mit den bekannten JH-Keimbahnsequenzen abgeglichen. Abweichungen innerhalb der CDR-3 Region werden nicht zu den Mutationen hinzugezählt. Um eine Sequenz als produktiv zu kennzeichnen, muss die Bedingung erfüllt sein, dass der CDR-3 Abschnitt in Basentriplets aufteilbar ist. Nur so ist die Translation zum Protein möglich. Die Länge des CDR-3 Segments wird durch Auszählen der Codons zwischen Codon 95 und Codon 102 bestimmt. Bei unproduktiven Sequenzen wird die Länge als n Codons + n Basenpaare angegeben. Stoppcodons dürfen innerhalb der CDR-3-Region nicht ermittelt werden. Die Länge des CDR-3 Abschnitts des Immunglobulinschwerkettengens wird nach Kabat bestimmt. Ausschlaggebend ist die Länge zwischen Codon 95 und 102.

2.2.11 Zytogenetische Diagnostik mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Analysen zur CLL-8 Studie mit der Fragestellung nach zytogenetischen Veränderungen wie chromosomale Aberrationen erfolgten, wie in Vorarbeiten beschrieben, mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Folgende Aberrationen waren Ziel der Untersuchung: Deletion 11q, Deletion 17p, Deletion 13q und Trisomie 12q sowie die seltenen Veränderungen Translokationen t(11;14) und t(14;18), Trisomie 8q, Trisomie 3q und Deletion 6q. Es wurden die folgenden Sonden verwendet:

Vysis LSI IGH/CCND1XT

Vysis LSI D13S319

Vysis LSI TP53

Vysis LSI ATM

Vysis LSI CCND1 BA

Vysis LSI IGH/MYC/Cep8

Vysis LSI TRAD

2.2.12 Statistik

Zur Auswertung der Überlebensdaten (progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben) wurden die statistischen Verfahren „arithmetisches Mittel“, „Median“, „p-Wert“, „Chi-Quadrat Test“ und der „Kaplan Meier Schätzer“ verwendet. Das Patientenkollektiv wurde hierzu als Gesamtheit untersucht sowie in einzelnen Subgruppen nochmals getrennt betrachtet. Zur Betrachtung kamen dabei nur genetisch definierte Subgruppen, die mindestens 25 Patienten umfassten. Für jede der im Ergebnisteil aufgeführten *IGHV*-Familien wurden Daten zum Gesamt- und progressionsfreien Überleben erhoben. Diese Auswertung auf Subgruppenebene war im Studienprotokoll der CLL-8 Studie so zunächst nicht vorgesehen, dementsprechend ist die statistische Aussagekraft der Einzelanalysen nicht mit der des Gesamtkollektivs gleichzusetzen. Es handelt sich somit um eine explorative Auswertung zum Erkennen von Trends und zur Generierung bzw. Untermauerung von Hypothesen, welche in weiteren Studien explizit überprüft werden müssen.

Folgende Analysen wurden durchgeführt. Relevante Ergebnisse wurden zudem in Kaplan-Meier-Schätzern grafisch veranschaulicht.

Gesamtkollektiv:

OS, *IGHV mutiert vs. IGHV unmutiert*

PFS, *IGHV mutiert vs. IGHV unmutiert*

OS, FC vs. FCR

PFS, FC vs. FCR

IGHV-1, 3 und 4

OS, *IGHV-() mutiert vs. IGHV-() unmutiert*

PFS, *IGHV-() mutiert vs. IGHV-() unmutiert*

OS, FC vs. FCR

PFS, FC vs. FCR

VH1-69, 3-21, 3-23, 3-30, 3-48 und 4-34

OS, *IGHV-() mutiert vs. IGHV-() unmutiert*

PFS, *IGHV-() mutiert vs. IGHV-() unmutiert*

OS, FC vs. FCR

PFS, FC vs. FCR

nur *mutiert:* **OS,** FC vs. FCR

nur *mutiert*: **PFS**, FC vs. FCR

nur *unmutiert*: **OS**, FC vs. FCR

nur *unmutiert*: **PFS**, FC vs. FCR

Zytogenetische Veränderungen del17p, del13q, del11q und +12q

OS, *IGHV mutiert* vs. *IGHV-() unmutiert*

PFS, *IGHV-() mutiert* vs. *IGHV-() unmutiert*

OS, FC vs. FCR

PFS, FC vs. FCR

Zusätzlich bei del13q und +12q:

nur *mutiert*: **OS**, FC vs. FCR

nur *unmutiert*: **OS**, FC vs. FCR

Die mathematisch-statistischen Formeln lauten wie folgt:

Arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Median

$$x_{\text{med}} = u_m + \frac{\frac{n}{2} - \sum_{k=1}^{m-1} n_k}{n_m} \cdot (o_m - u_m).$$

p-Wert – statistische Signifikanz

$$p = P(T > t | H_0)$$

Chi-Quadrat-Test

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^m \frac{(N_j - n_{0j})^2}{n_{0j}}$$

Sämtliche Zeitangaben wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

Kaplan-Meier-Schätzer

Der für die Datenauswertung zugrundeliegende Dateityp war Microsoft Excel (.xls). Anschließend Umwandlung der Daten in Tabstopp getrennten Text (.txt). Die Kaplan-Meier Überlebenskurven wurden mit dem Open Source Statistikprogramm „R“ erstellt. Zur Erstellung der Kurve muss die Information zum Überlebensstatus in eine binäre Aussage umgewandelt werden: alive, censored = 0; PD, dead, death = 1.

Beispielhaft wird im Folgenden der Befehltext zur Erstellung einer Kaplan-Meier Kurve aufgeführt. **Hervorgehoben** sind die Größen, welche der jeweiligen Fragestellung anzupassen sind.

```

data <- read.table("./Name.txt", header=T, sep="\t",row.names=NULL,as.is=T,
skip=0, fill=T, na.strings=c("n.k. "))
dim(data)
names(data)
library(survival)
fit <- survfit(Surv(data$SpalteX(Zeit), data$SpalteY(1,0))~SpalteZ(Kategorie).,
data=data, na.action=na.omit)
fit
summary(fit)
par(mfrow=c(1,1), xpd=T, mgp=c(2.5,0.5,0), mar=c(10,10,3,1), tck=-0.01 ,
col=c(1))
plot(fit, xlab="Zeit (Monate)", ylab="Überleben (%)",col.lab = "black",
xaxt="n", yaxt="n", , col=c(1,2,3,4,5,6,7), mark=3 , conf.int=F)
axis(side=1, at=seq(0,80,6), label=seq(0,80,6), las=1,adj=0.5, col.main = "black",
col=c(1), col.axis = "black")
axis(side=2, at=seq(0,1,0.25), label=seq(0,100,25), las=1, adj=1, col=c(1),
col.axis = "black")
fit <- survdiff(Surv(data$SpalteX(Zeit), data$SpalteY(1,0))~SpalteZ(Kategorie).
data=data, na.action=na.omit)
fit
summary(data$SpalteX) # Inhalt von X numerisch

```

3. Ergebnisse

3.1 Überblick

In die CLL-8 Studie wurden insgesamt 817 Patienten eingeschlossen. Innerhalb der Kollektivs wurde zwischen den beiden Behandlungsarmen FC vs. FCR randomisiert. 409 Patienten wurden einer Behandlung nach dem FC-Schema und 408 Patienten einer Behandlung nach dem FCR-Schema zugeteilt. Das mediane Alter betrug für beide Studienarme 61 Jahre. Die Geschlechterverteilung war in beiden Armen identisch (männlich: 74,3 %, weiblich: 25,7 %). Die Stadieneinteilung verteilte sich wie folgt auf die beiden Arme: Im FC-Arm erfüllten 22 Patienten die Kriterien des Stadiums Binet A, 259 Binet B und 126 Binet C. Im FCR-Arm waren 18 Patienten im Stadium Binet A, 263 im Stadium Binet B und 126 im Stadium Binet C.

Es zeigte sich für Patienten, die mit der Chemoimmunotherapie nach dem FCR-Schema behandelt wurden, eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (Hazard Ratio 0,67; 95 %-Konfidenzintervall 0,48-0,92; $p=0,012$) (Hallek *et al.* 2010).

In der weiterführenden Analyse des Kollektivs im Hinblick auf die Verteilung der *IGHV*-Gene wurden folgende Ergebnisse erhoben:

Resultate zum *IGHV* Mutationsstatus konnten für 621 Patienten erhoben werden. Hiervon wurden 391 als *IGHV*-unmutiert und 230 als *IGHV*-mutiert kategorisiert. Als Unterscheidungsmerkmal zur Feststellung des Mutationsstatus wurde ein Cut-Off von 98 % definiert. Bei einer Homologie von < 98 % wurde die CLL als *IGHV* mutiert eingestuft. Im Gesamtüberleben zeigte sich ein Vorteil zugunsten des Kollektivs der Patienten mit mutiertem *IGHV* (Abb. 4C).

In der weiteren Unterscheidung nach Therapiemodalität und *IGHV* Mutationsstatus zeigten sich folgende Ergebnisse:

In der Gruppe der 229 Patienten mit mutiertem *IGHV* konnte im FC-Arm bei 24 von 116 Patienten (21 %) eine komplette Remission erzielt werden. Die Gesamtansprechrage lag bei 84 %.

Im FCR-Arm (113 Patienten) lag die Rate der kompletten Remission mit 50 % signifikant höher ($p<0,0001$). Im Gegensatz dazu lag die Gesamtansprechrage mit 93 % nur geringfügig und statistisch nicht signifikant ($p=0,06$) über der Vergleichsgruppe.

Die 390 Patienten mit unmutiertem *IGHV* zeigten in allen Gruppen ein geringeres Ansprechen. So lag die Rate der kompletten Remissionen bei den mit FC therapierten

Patienten bei 19 % und das Gesamtansprechen bei 76 %. Mittels Chemoimmuntherapie konnte in 40 % der Patienten mit unmutiertem *IGHV*-Status eine komplette Remission erzielt werden, wobei die Gesamtansprechrates mit 91 % im Vergleich zur Gruppe der *IGHV* mutierten ähnlich hoch lag.

Im untersuchten Zeitraum lag das mediane Gesamtüberleben in der Gruppe der Patienten mit FCR mit 49,42 Monaten um 4,06 Monate höher als bei der Gruppe mit FC (45,4 Monate). Das mediane progressionsfreie Überleben konnte durch FCR um 15,3 Monate verlängert werden (FCR: 44,4 Monate; FC: 29,1 Monate) (Hallek et al. 2010).

Die Abb.4, A-D zeigt Kaplan-Meier-Kurven zum gesamten untersuchten Kollektiv.

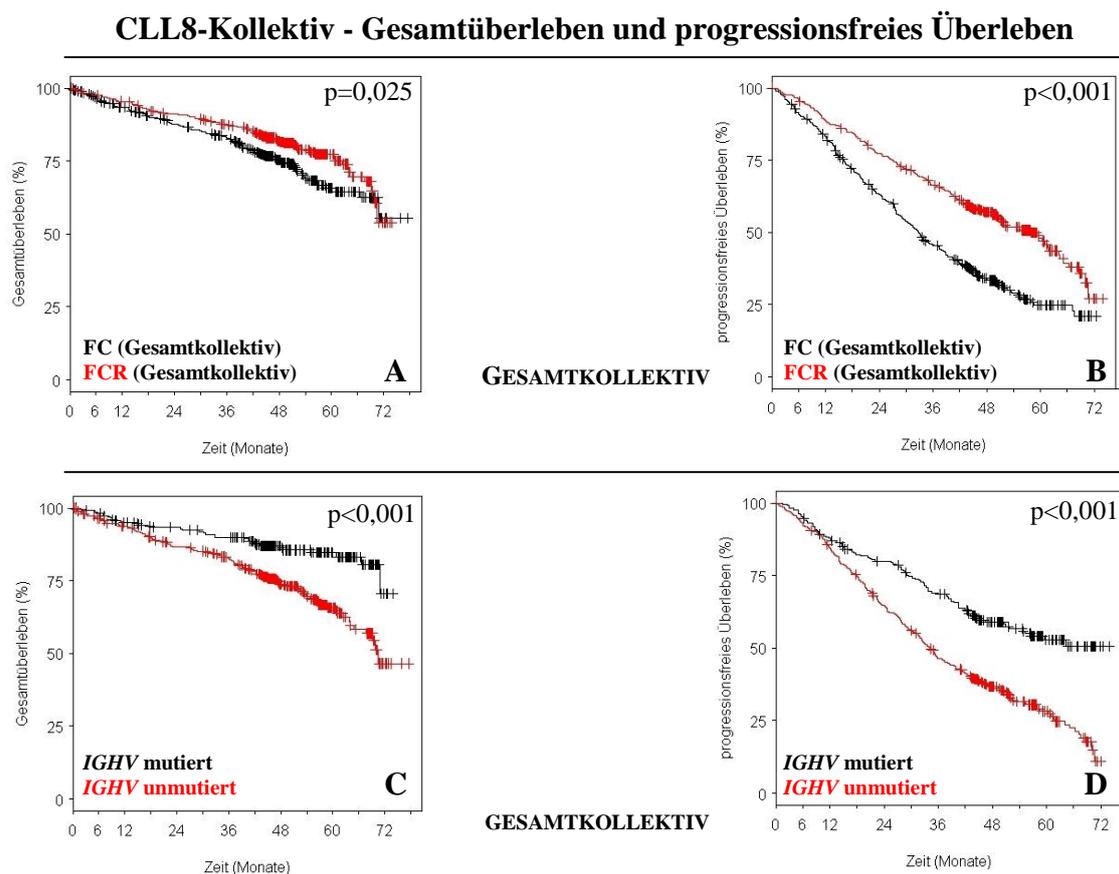


Abbildung 4, A-D:

Analyse des Gesamtkollektivs der Patienten mit innerhalb der CLL-8 Studie (817 Patienten, davon 621 Datensätze zur Auswertung des *IGHV* Status). A: OS, FC/FCR, B: PFS, FC/FCR. C: OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, D: PFS, FC/FCR, *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/ Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/ Cyclophosphamid/ Rituximab, OS: Overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), CLL: chronische lymphatische Leukämie

3.2 IGHV Struktur und VDJ-Verteilung

Die IGHV Familien 1, 3 und 4 konnten in 581 von 621 (93,5 %) der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Patienten mit mutiertem und unmutiertem IGHV-Status waren innerhalb der IGHV Familien 3 und 4 ähnlich verteilt, während innerhalb der IGHV Familie 1 Patienten mit unmutiertem IGHV-Status mehrheitlich vorlagen (Tab. 10, 11, 12).

Insgesamt konnten 19 verschiedene Joining (J)-Segmente identifiziert werden. Mit zusammen 387/621 (62,3 %) waren die J-Segmente JH4b und JH6b dabei vorherrschend. Eine Analyse der Daten zum Gesamtüberleben erbrachte einen positiven Trend für die Gruppe der Patienten mit JH4b, welcher allerdings mit einem p-Wert von 0,093 das Signifikanzniveau verfehlte. Der Vorteil erklärt sich am ehesten damit, dass bei Patienten mit Nachweis des J-Segments JH4b der Anteil mutierter Rearrangements mit 111/150 (74 %) besonders hoch war.

Innerhalb des Kollektivs konnten 31 verschiedene Diversity (D)-Segmente gefunden werden. Das D-Segment D3-3 war in 135/621 (21,7 %) vertreten und somit am Häufigsten. Bei 53 Fällen konnte kein D-Segment identifiziert werden. Die genauere Analyse dieser 53 Patienten zeigte eine verlängerte Überlebenszeit (*Median: 57,0 Monate, MW: 51,7 Monate 1. Quartile: 45,1 Monate, 3. Quartile: 63,5 Monate, [6,3 , 70,5]*) für genau diese Patienten gegenüber dem Gesamtkollektiv (*Median: 47,3 Monate, MW: 44,3 Monate 1. Quartile: 39,0 Monate, 3. Quartile: 56,7 Monate, [0,0 , 77,5]*). Auch hier lag der Anteil der Patienten mit mutiertem Rearrangement (67 %) höher als im Gesamtkollektiv. Zudem konnten innerhalb dieser Gruppe 32 Patienten (60 %) identifiziert werden mit einer Deletion 13q, welche ebenfalls mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist. Die mit einer ungünstigen Prognose assoziierte Deletion 17p war hingegen in keinem der Fälle nachweisbar.

Die Analyse der CDR-3 Länge erbrachte signifikante Unterschiede zwischen mutierten und unmutierten Subgruppen. Bei mutierten Rearrangements war die CDR-3 Länge verkürzt (*Median: 15 BP, MW: 14,8 BP 1. Quartile 12 BP, 3. Quartile: 17 BP, [7 , 26]*) gegenüber jener unmutierter Rearrangements (*Median: 21 BP, MW: 20,2 BP 1. Quartile: 18 BP, 3. Quartile: 23 BP, [8 , 31]*). In Abb. 5 sind die strukturellen Eigenschaften der CDR-3 Segmente erläutert. Die kurzen, waagrechten Kennzeichnungen beschreiben, wie

häufig die einzelnen CDR-3 Segmente vorkommen. Es wurden CDR-3 Segmente in Längen zwischen 7 und 31 Basenpaaren gefunden. Im Boxplot erfolgt die Darstellung von *IGHV* mutierten und unmutierten Proben.

Durch den Mutationsvorgang verlieren die CDR-3 Regionen an Länge. Dies hatte im untersuchten Kollektiv eine Assoziation mit dem Verlauf der Erkrankung: Untersucht wurden hierbei 50 Patienten mit einer CDR-3 Länge von 7 bis 11 Basenpaaren, gegen 50 Patienten mit einer CDR-3 Längen zwischen 24 und 31 Basenpaaren. Beim progressionsfreien Überleben wurde eine statistisch signifikante Verlängerung zu Gunsten der kürzeren CDR-3 Segmente beobachtet ($p=0,005$). Anders beim Gesamtüberleben: zwar zeigte sich ein Trend, dass Patienten mit kürzeren CDR-Regionen einen Vorteil beim Gesamtüberleben haben, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($p=0,091$).

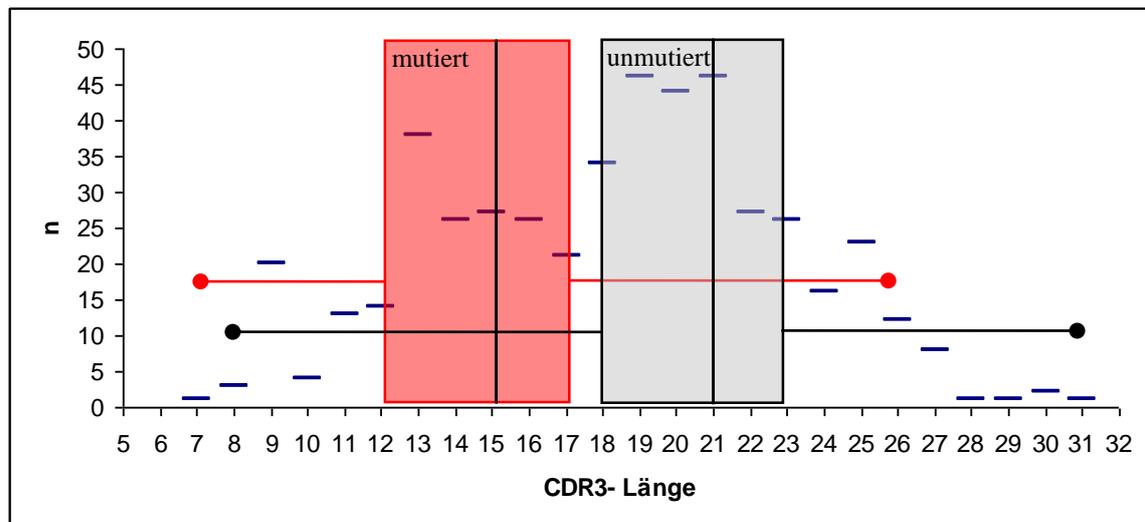


Abbildung 5:
CDR-3-Länge und Häufigkeitsverteilung (621 Patienten). Boxplot mit Darstellung von Median, Mittelwert, Quartilen und Extremwerten. n: Anzahl, CDR: complementary determining region

Subgruppenanalyse der *IGHV* Familien und ausgewählter *IGHV*-Gene

Das homogene CLL-8-Kollektiv ermöglichte eine gute Abbildung der einzelnen Parameter zur Risikostratifizierung. Da der Fokus dieser Arbeit auf die *IGHV* Mutationsanalyse gerichtet war, wird diese in diesem Abschnitt vorrangig untersucht. Weitere bekannte Faktoren werden primär hierzu in Bezug gesetzt. Zunächst werden die einzelnen *IGHV* Familien *VH1*, *VH3* und *VH4* untersucht. Ebenso wurde für einige, im Verhältnis häufige Untergruppen, der Einfluss der Chemoimmuntherapie auf Patienten mit mutierten und unmutierten CLL-Klonen ermittelt.

3.2.1 *VH1* – *VH1-69*

Die *IGHV* Familie *VH1* stellt bei der VDJ Rekombination bei chronischer lymphatischer Leukämie zahlenmäßig die zweithäufigste *VH*-Familie nach *IGHV-3* dar (193 Patienten). Auffällig, und in anderen Arbeiten bereits vorbeschrieben, war der sehr hohe Anteil unmutierter Zellklone. Im untersuchten Kollektiv betrug dieser Anteil 89 % (21 mutiert, 172 unmutiert). Innerhalb der *IGHV-1* Familie konnten acht verschiedene Gene, hierunter das Gen *VH1-69* mit einem Anteil von ca. 67 %, identifiziert werden. In dieser Untergruppe war der Anteil der unmutierten Proben mit 95 % noch höher als im Gesamtkollektiv (Tab. 8).

Die Betrachtung von OS und PFS zeigte den graphisch anhand einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellten Zusammenhang zwischen Mutationsstatus, Überleben und Therapie (Abb. 6, A-D). Gesondert wurde das Gen *VH1-69* untersucht.

An Hand dieser Untersuchungen zeigte sich, dass der sehr hohe Anteil unmutierter Zellklone zu einem statistisch relevant schlechteren Gesamtüberleben führte. Besonders deutlich war dies in der Gruppe der Patienten, bei denen die chronische lymphatische Leukämie das Gen *VH1-69* trug. Das Risiko eines schwerwiegenden Verlaufs mit kürzerer Überlebenszeit war hier noch einmal erhöht. Der Einfluss auf das Gesamtüberleben war durch Hinzunahme des Immuntherapeutikums Rituximab bei den *IGHV* unmutierten Zellklonen weniger deutlich als dies bei allen Patienten gemittelt der Fall war (Zugewinn am Gesamtüberleben: 2,2 Monate). In Bezug auf das progressionsfreie Überleben stellte sich ein Vorteil für die Patienten mit mutiertem VDJ Rearrangement dar. Hier lag der Anteil des verlängerten PFS über dem des Gesamtkollektivs. Auch für die Patienten mit unmutiertem *IGHV* Status konnte ein positiver Effekt nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufschlüsselung der Datensätze *IGHV-1* gesamt und *VH1-69* zur Ermittlung der Auswirkung der Therapiemodalitäten auf mutierte bzw. unmutierte *IGHV* Rearrangements war auf Grund der geringen Fallzahl mutierter Zellklone statistisch nicht möglich. Eine Aussage zu unmutierten *IGHV* Rearrangements kann dahingegen sehr genau getroffen werden. Auf die separate Darstellung von *VH1-69* in einem Kaplan-Meier-Schätzer wurde verzichtet.

Tabelle 8:

IGHV Familie: IGHV-1. Häufigkeiten der unterschiedlichen V-Gene. n: Anzahl, mut: mutiert, unmut: unmutiert, *IGHV*: variabler Teil der Immunglobulinschwerkette

	<i>IGHV1</i>		<i>VH1-02</i>		<i>VH1-03</i>		<i>VH1-08</i>		<i>VH1-18</i>		<i>VH1-24</i>		<i>VH1-46</i>		<i>VH1-58</i>		<i>VH1-69</i>	
n	193		27		13		3		3		5		10		1		129	
mut./unmut.	21	172	4	23	3	10	3	0	1	2	2	3	3	7	0	1	6	123

Tabelle 9:

Überlebensdaten. Ermittlung von Median, Mittelwert, Minimum und Maximum sowie dem Überlebenszugewinn durch Chemoimmuntherapie. *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/ Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/ Cyclophosphamid/ Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), Min: Minimum, Max: Maximum, Zeiteinheit: Monate

<i>IGHV</i>	Therapie	Median	Mittelwert	[Min...Max]	Zugewinn
<i>VH1_OS</i>	FC	44,8	40,1	[0,5 , 72,4]	
<i>VH1_OS</i>	FCR	47,0	45,7	[1,9...73,4]	+2,2
<i>VH1_PFS</i>	FC	24,6	28,1	[0,0...44,5]	
<i>VH1_PFS</i>	FCR	41,3	36,9	[1,9...50,4]	+16,7
<i>VH1-69_OS</i>	FC	44,6	38,9	[3,4...71,6]	
<i>VH1-69_OS</i>	FCR	45,6	44,8	[1,9...73,4]	+1,0
<i>VH1-69_PFS</i>	FC	24,9	27,5	[0,0...68,9]	
<i>VH1-69_PFS</i>	FCR	39,4	34,8	[1,9...70,3]	+14,5

VH1 - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

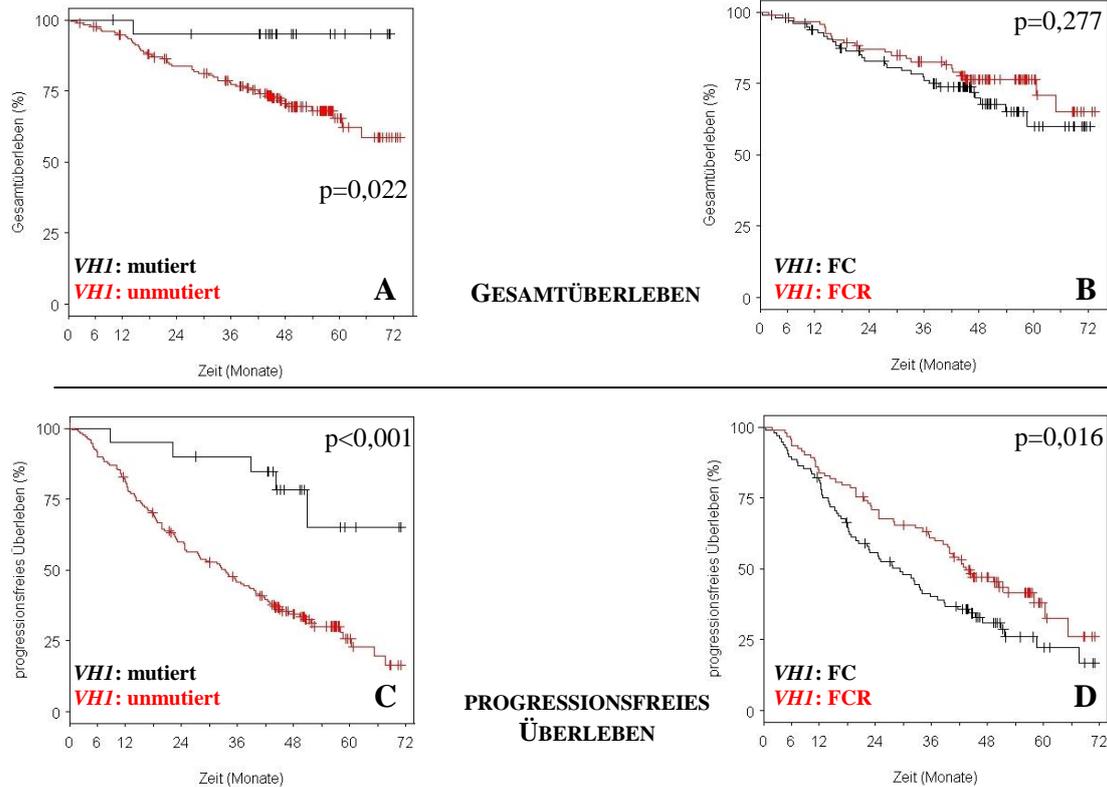


Abbildung 6, A-D:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit IGHV-1 (193 Patienten). **A:** OS, IGHV mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, IGHV mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/- Rituximab, OS: Overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

3.2.2 VH3 – VH3-21, VH3-23, VH3-30 und VH3-48

Die zahlenmäßig stärkste Gruppe repräsentiert die IGHV Familie VH3. Im Kollektiv der CLL-8 Studie konnte diese bei 291 Patienten identifiziert werden. Im Gegensatz zur IGHV Familie VH1 mit beinahe ausschließlich unmutierten VDJ Rearrangements war das Verhältnis zwischen mutierten und unmutierten Zellklonen innerhalb der VH Familie 3 ausgewogen (1:1,7). Die Familie war mit 25 nachgewiesenen VH-Genen sehr heterogen (Tab. 10).

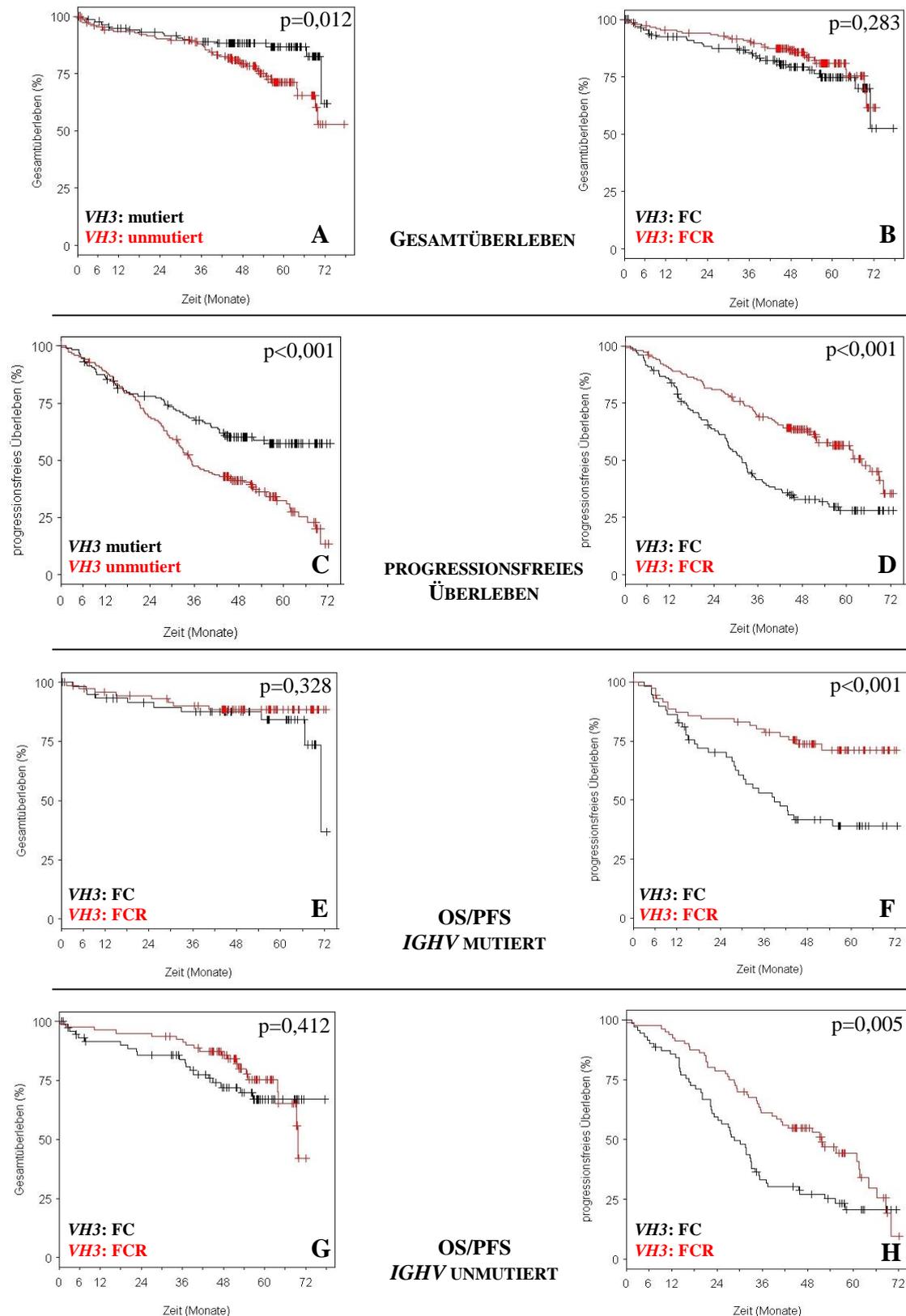
Entsprechend des obigen Vorgehens wurden OS und PFS anhand Kaplan- Meier Schätzern für die gesamte VH Familie 3 betrachtet (Abb.7, A-H). Näher untersucht wurden die am häufigsten vorkommenden Subgruppen VH3-21 (n=36); (Abb. 8), VH3-23 (n=30); (Abb. 9) VH3-30 (n=42); (Abb. 10) und VH3-48 (n=25); (Abb. 11)

Tabelle 10:

IGHV Familie: VH3. Häufigkeiten der unterschiedlichen V-Gene. n: Anzahl, mut: mutiert, unmut: unmutiert, VH: variabler Teil der Immunglobulinschwerkette

	VH-3		VH3-07		VH3-08		VH3-09		VH3-11		VH3-13		VH3-15		VH3-20		VH3-21	
n	291		17		2		11		27		4		8		3		36	
mut./unmut.	134	157	12	5	0	2	3	8	4	23	3	1	6	2	0	3	17	19
	VH3-23		VH3-30		VH3-33		VH3-34		VH3-35		VH3-38		VH3-43		VH3-48		VH3-49	
n	30		42		21		1		1		1		6		25		4	
mut./unmut.	16	14	16	26	4	17	1	0	1	0	1	0	1	5	12	13	2	2
	VH3-53		VH3-64		VH3-65		VH3-66		VH3-72		VH3-73		VH3-74		VH3-D			
n	11		6		1		10		4		3		13		5			
mut./unmut.	7	4	4	2	0	1	7	3	4	5	0	1	7	6	5	0		

In der großen Gruppe der Patienten mit Genen aus der *IGHV* Familie *VH3* ließen sich gemittelt ähnliche Verläufe erheben wie beim Gesamtkollektiv. Es zeichnete sich allerdings ein noch deutlicherer Vorteil im progressionsfreien Überleben durch die Gabe von FCR ab. Beim Gesamtüberleben wurde bei Patienten mit mutiertem *IGHV* Mutationsstatus durch Rituximab keine statistisch signifikante Verbesserung erzielt (Abb. 8E, $p=0,328$). Auf Grund der relativ guten Prognose und der andauernden Nachbeobachtung könnte sich hier eine Auftrennung zwischen den beiden Armen im Verlauf noch herauskristallisieren.

VH3 - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben**Abbildung 7, A-H:**

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH3 (291 Patienten). **A:** OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, **E:** OS, nur *IGHV* mutiert, FC/FCR, **F:** PFS, nur *IGHV* mutiert, FC/FCR, **G:** OS, nur *IGHV* unmutiert, FC/FCR, **H:** PFS, nur *IGHV* unmutiert, FC/FCR.

IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

Wie oben bereits aufgeführt, wurden 36 Patienten mit dem *IGHV* Gen *VH3-21* identifiziert. 17 Patienten hatten ein mutiertes *IGHV* Rearrangement, 19 Patienten ein unmutiertes *IGHV* Rearrangement.

Für diese Patienten konnte an Hand der *IGHV*-Mutationsanalyse in Bezug auf Gesamt- und progressionsfreies Überleben kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit mutiertem und unmutiertem *IGHV* Mutationsstatus beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich ein gewisser Trend zu einem positiven Einfluss von Rituximab, insbesondere bei Patienten mit mutiertem *IGHV* Status. Auf Grund der geringen Fallzahl war hier allerdings kein statistisch verlässliches Ergebnis zu erwarten.

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit dem Gen *VH3-23* (30 Patienten, 16 mutiert, 14 unmutiert) zeigte sich für das progressionsfreie Überleben ein signifikanter Vorteil für die Patienten mit mutiertem *IGHV* Status ($p=0,02$). Allerdings konnte durch Rituximab keine weitere signifikante Verbesserung bei dieser Patientengruppe erzielt werden und zwar weder beim Gesamtüberleben – noch beim progressionsfreien Überleben.

Bei 42 Patienten wurde das *IGHV* Gen *VH3-30* identifiziert. Für diese Subgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen mutiertem (16 Patienten) und unmutiertem (26 Patienten) *IGHV* Status ermittelt werden. Vorbehaltlich der insgesamt doch relativ geringen Fallzahl, zeigte auch die Auswahl der Therapie hier keinen statistisch signifikanten Einfluss.

In immerhin 25 Fällen wurde das *IGHV* Gen *VH3-48* umgelagert. Das Verhältnis zwischen mutierten und unmutierten Rearrangements lag bei nahezu 1:1. Der Effekt von Rituximab zeigte sich hier lediglich beim progressionsfreien Überleben von Patienten mit mutiertem *IGHV*. Auch hier ist die geringe Fallzahl entscheidend bei der Interpretation der Statistik.

VH3-21 - progressionsfreies Überleben

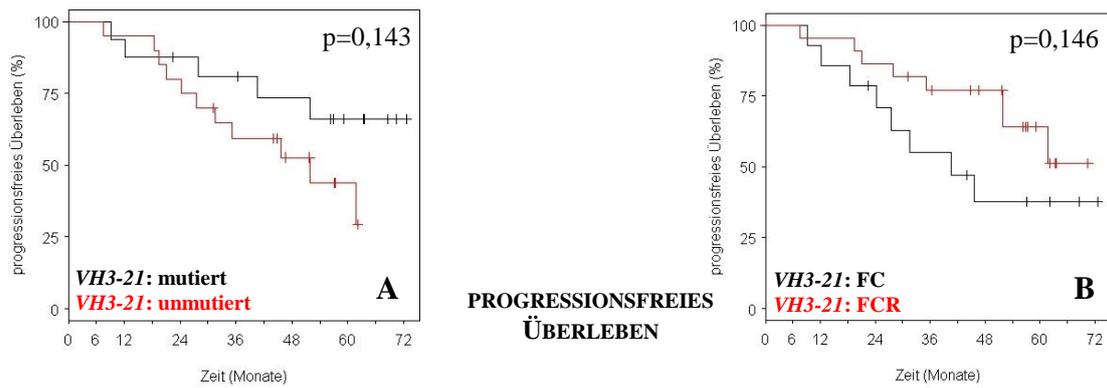


Abbildung 8, A-B

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH3-21 (36 Patienten). **A:** PFS, IGHV mutiert/unmutiert, **B:** PFS, FC/FCR. IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/- Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

VH3-23 - progressionsfreies Überleben

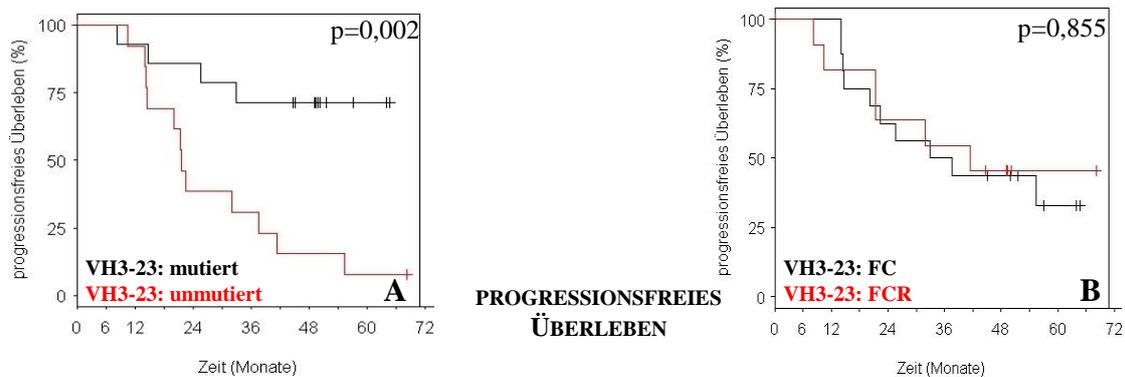


Abbildung 9, A-B:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH3-23 (30 Patienten). **A:** PFS, IGHV mutiert/unmutiert, **B:** PFS, FC/FCR. IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

VH3-30 - progressionsfreies Überleben

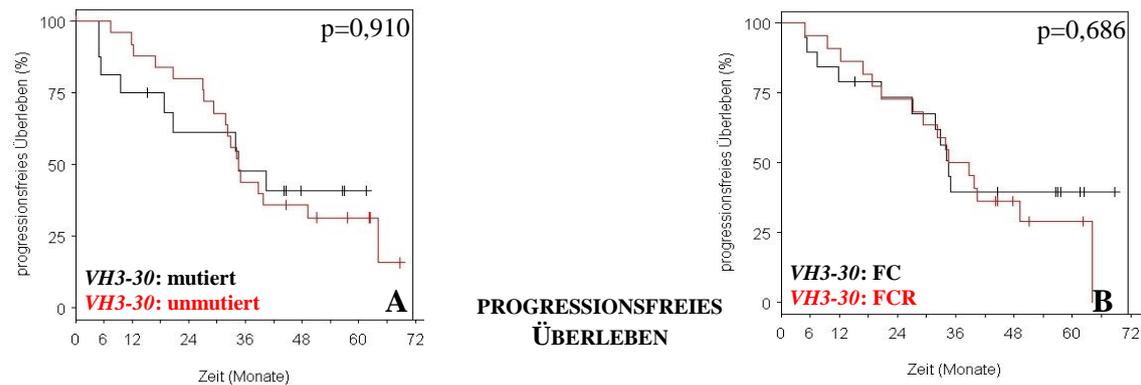


Abbildung 10, A-B:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH3-30 (42 Patienten). A: PFS, IGHV mutiert/unmutiert, B: PFS, FC/FCR.

IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

VH3-48 - progressionsfreies Überleben

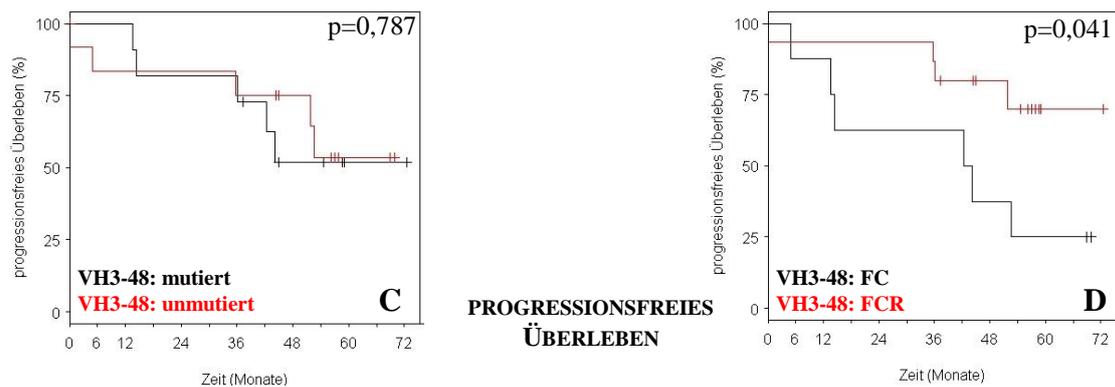


Abbildung 11, A-B:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH3-48 (25 Patienten). A: PFS, IGHV mutiert/unmutiert, B: PFS, FC/FCR.

IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

Tabelle 11:

Überlebensdaten. Ermittlung von Median, Mittelwert, Minimum und Maximum sowie dem Überlebenszugewinn durch Chemoimmuntherapie. *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, *FC*: Fludarabin/ Cyclophosphamid, *FCR*: Fludarabin/ Cyclophosphamid/ Rituximab, *OS*: overall survival (Gesamtüberleben), *PFS*: progression free survival (progressionsfreies Überleben), *Min*: Minimum, *Max*: Maximum, *mut*: mutiert, *unmut*: unmutiert, Zeiteinheit: Monate

<i>IGHV</i>	Therapie	Median	Mittelwert	[Min...Max]	Zugewinn
<i>VH3mut_OS</i>	<i>FC</i>	46,6	45,5	[0,4...72,6]	
<i>VH3mut_OS</i>	<i>FCR</i>	49,4	48,6	[1,4...72,5]	+2,8
<i>VH3mut_PFS</i>	<i>FC</i>	32,7	33,6	[0,0...72,6]	
<i>VH3mut_PFS</i>	<i>FCR</i>	47,8	43,8	[0,0...72,5]	+15,1
<i>VH3unmut_OS</i>	<i>FC</i>	45,8	41,7	[0,0...77,5]	
<i>VH3unmut_OS</i>	<i>FCR</i>	52,0	50,7	[0,3...72,1]	+6,2
<i>VH3unmut_PFS</i>	<i>FC</i>	23,7	28,1	[0,0...71,4]	
<i>VH3unmut_PFS</i>	<i>FCR</i>	44,7	40,7	[0,14...72,1]	+21,0

3.2.3 *VH4 – VH4-34*

Im untersuchten Kollektiv waren für 97 Patienten *IGHV*-Rearrangements der Familie *VH4* nachweisbar. Das Verhältnis mutiert/unmutiert betrug nahezu 1:1. *VH4-34* war mit 36 Fällen besonders häufig und wurde gesondert untersucht.

Tabelle 12:

***IGHV* Familie: *VH4*.** Häufigkeiten der unterschiedlichen *V*-Gene. *n*: Anzahl, *mut*: mutiert, *unmut*: unmutiert, *VH*: variabler Teil der Immunglobulinschwerkette

	<i>VH4</i>		<i>VH4-04</i>		<i>VH4-30</i>		<i>VH4-31</i>		<i>VH4-34</i>		<i>VH4-39</i>		<i>VH4-59</i>		<i>VH4-61</i>		<i>VH4-B</i>	
n	97		6		7		3		36		19		10		7		9	
mut./unmut.	49	48	5	1	3	4	3	0	24	12	4	15	3	7	4	3	3	6

Die Analyse des Kollektivs zeigte einen klaren Vorteil für die Patienten mit mutiertem *IGHV* Rearrangement. Die Therapiemodalität hatte sowohl beim progressionsfreien Überleben als auch beim Gesamtüberleben einen geringeren Einfluss als bei anderen Subgruppen.

VH4 - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

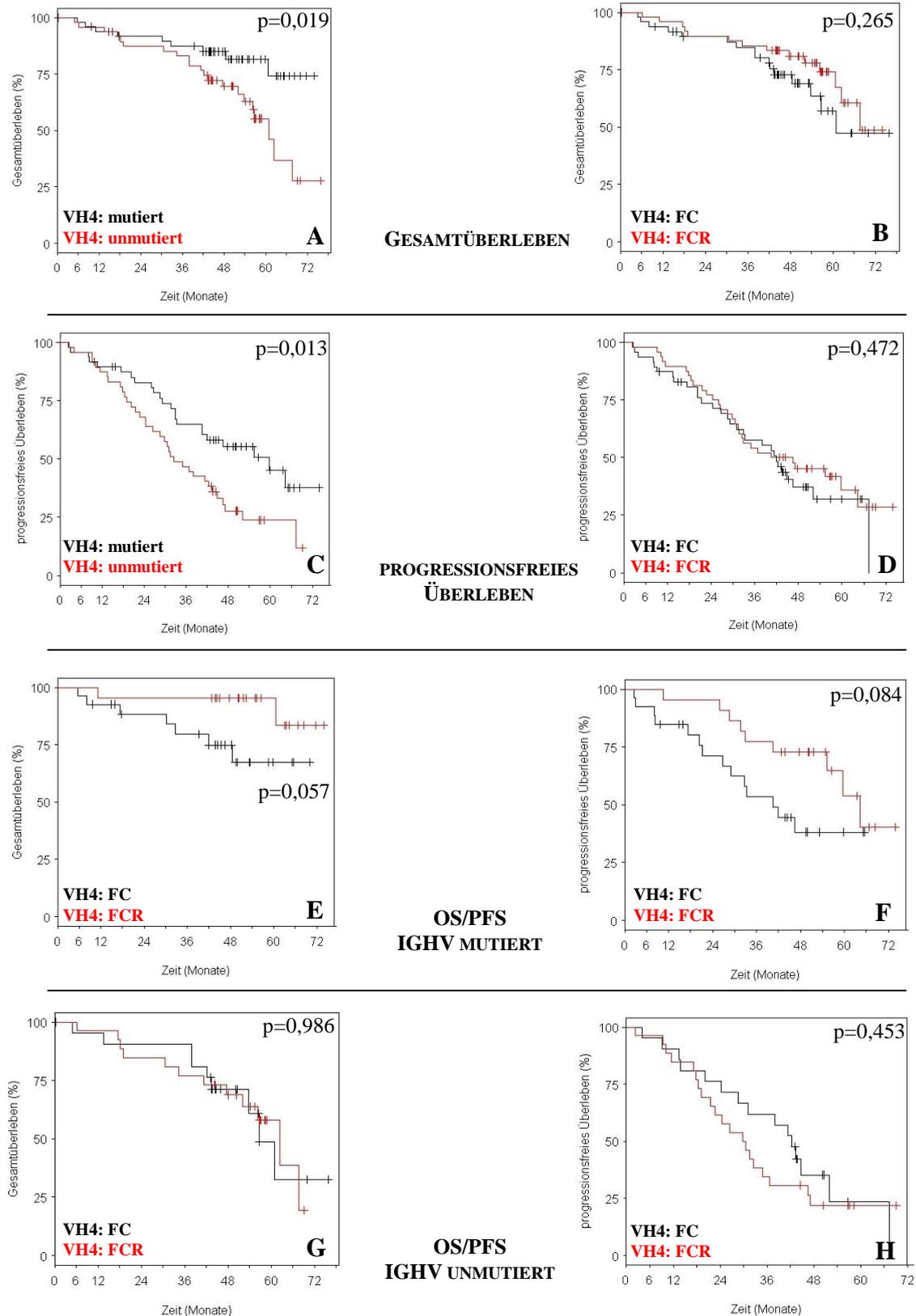


Abbildung 12, A-H:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH-4 (97 Patienten). **A:** OS, IGHV mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, IGHV mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, **E:** OS, nur IGHV mutiert, FC/FCR, **F:** PFS, nur IGHV mutiert, FC/FCR, **G:** OS, nur IGHV unmutiert, FC/FCR, **H:** PFS, nur IGHV unmutiert, FC/FCR.

IGHV (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

VH4-34 - progressionsfreies Überleben

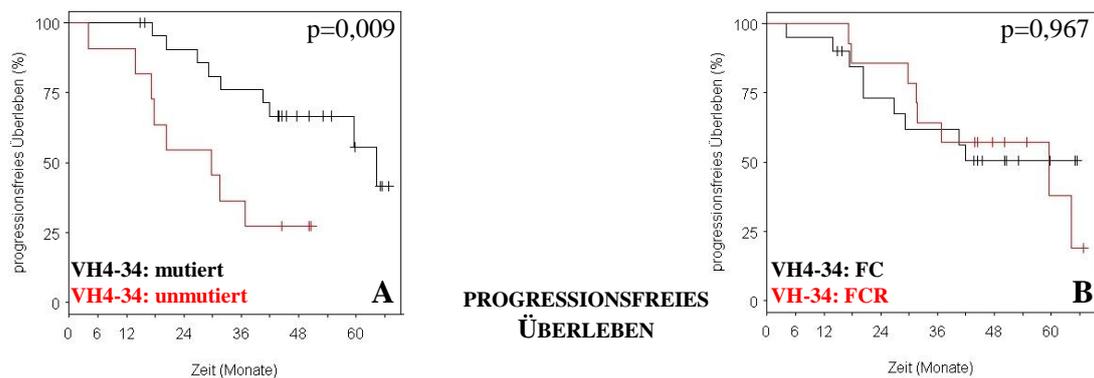


Abbildung 13, A-B:
Analyse der Subgruppe der Patienten mit VH4-34 (36 Patienten. A: PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** PFS, FC/FCR, *IGHV* (VH): Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben)

3.2.4 VH 2, VH5, VH6 und VH7

Auf Grund der geringen Fallzahlen war eine aussagekräftige, statistische Auswertung der *IGHV* Familien *VH2* (n=12), *VH5* (n=16), *VH6* (n=5) und *VH7* (n=2) nicht sinnvoll möglich. In Tab. 13 Leistung der einzelnen identifizierten Gene und der Verteilung des Mutationsstatus. Die Daten zu Gesamt- und progressionsfreiem Überleben wurden nicht mittels Kaplan-Meier Kurven dargestellt.

Tabelle 13:
***IGHV* Familien: VH2, 5, 6 und 7.** Häufigkeiten der unterschiedlichen *VH*-Gene. n: Anzahl, mut: mutiert, unmut: unmutiert, *IGHV*: variabler Teil der Immunglobulinschwerkette

	VH2		VH5		VH6		VH7		VH2-05		VH2-10		VH2-70		VH5-51		VH5-A	
n	12		16		5		2		7		1		4		11		5	
mut./unmut.	9	3	9	7	4	1	1	1	1	4	1	0	2	2	8	3	1	4
	VH6-01		VH7-4															
n	5		2															
mut./unmut.	4	1	1	1														

3.3 Kombiniertes Vergleich verschiedener *IGHV*- Gen Subgruppen

Der Einfluss des *IGHV* Rearrangements auf das progressionsfreie Überleben konnte am besten durch eine kumulierte Abbildung der einzelnen *IGHV* Gene in einer Überlebenskurve (Abb. 14) dargestellt werden. Zum Erhalt der Übersicht wurden *IGHV*-Gene mit einer Häufigkeit von mindestens 25 Patienten (mut. + unmut) gewählt. Hier sollte nochmals auf die Homogenität des Patientenkollektivs hingewiesen werden, welche eine klinisch bedeutsame Auswertung erst ermöglichte. Für die Subgruppe *VH1-69* bestätigte sich die schlechtere Prognose. Besonders günstig verhielten sich die Zellklone mit Nachweis des Gens *VH3-48*.

Kumulierte Darstellung des progressionsfreien Überlebens von Patienten mit häufigen *IGHV* Genen (Anzahl im Kollektiv mindestens 25)

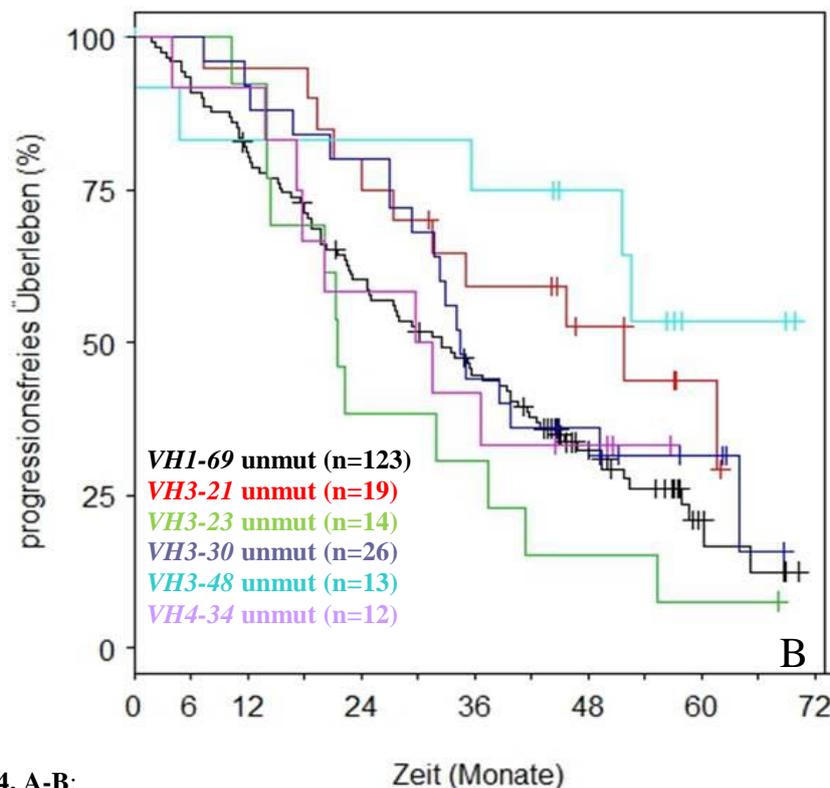
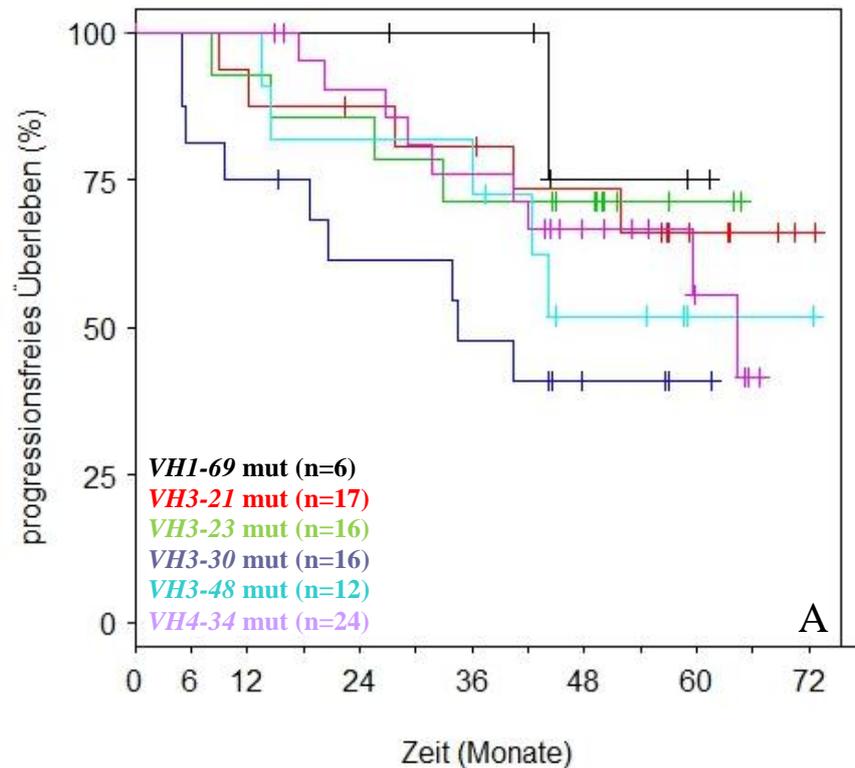


Abbildung 14, A-B:

Einfluss der *IGHV* Gene auf das progressionsfreie Überleben. Trennung zwischen mutiertem und unmutiertem *IGHV* Status. A: Kumulierte Darstellung der mutierten Klone, **B:** Kumulierte Darstellung der unmutierten Klone. Die Farben der Legende korrelieren mit den Farben der Kurven, *VH1-69*, [...], *VH4-34*: Name der *VH*- Gene.

3.4 Korrelation von chromosomalen Aberrationen und *IGHV*-Mutationsstatus

Im untersuchten Kollektiv der CLL-8 Studie wurden die Patienten auf das Vorliegen folgender zytogenetischer Veränderungen hin untersucht: Trisomie 3q27, Deletion 6q21, Trisomie 8q24, Deletion 11q23, Trisomie 12q13, Deletion 13q14, Deletion 17p13, sowie Translokationen in 14q32

Als häufigste chromosomale Aberration konnte in 338 Fällen die Deletion 13q nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Gruppe war der Verteilung zwischen *IGHV* mutierten und unmutierten Fällen beinahe ausgewogen. Ebenfalls sehr häufig mit insgesamt 152 Fällen war die Deletion 11q. Die Trisomie 12q war mit 70 Fällen etwas öfter vertreten als die Deletion 17p (51 Fälle). Bei den drei letztgenannten war der Anteil unmutierter *IGHV* Rearrangements deutlich erhöht und lag zwischen 69 % (+12q) und 89 % (Del 11q). Die weiteren oben genannten Aberrationen konnten nur in Einzelfällen nachgewiesen werden und spielten für die statistische Bewertung keine Rolle.

Tabelle 14:

Häufigkeit der unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen und Korrelation zum *IGHV* Status. *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline.

	Anzahl gesamt	<i>IGHV</i> mutiert	<i>IGHV</i> unmutiert
Deletion 13q	338	155 (46 %)	183 (54 %)
Trisomie 12q	70	22 (31 %)	48 (69 %)
Deletion 11q	152	16 (11 %)	136 (89 %)
Deletion 17p	51	13 (25 %)	38 (75 %)
Deletion 6q	1	0 (0 %)	1 (100 %)
Trisomie 8q	1	1 (100 %)	0 (0 %)
Trisomie 3q	3	1 (33 %)	2 (66 %)

3.4.1 Deletion 17p

Als prognostisch bedeutsamste zytogenetische Veränderung - und deshalb hier an erster Stelle - wurde in vielen Arbeiten die Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 identifiziert.

Diese Veränderung konnte bei 51 Patienten nachgewiesen werden. Es wurde untersucht, ob der *IGHV* Status bei Patienten mit nachgewiesener Deletion 17p13 innerhalb dieser Gruppe eine Veränderung im progressionsfreien und Gesamtüberleben bewirkt. Des Weiteren wurde der Therapieeffekt bewertet. Im Vergleich zu allen bisher untersuchten Subgruppen lagen bei Patienten mit Nachweis einer Deletion 17p13 in Übereinstimmung

mit Analysen aus entsprechenden Vorarbeiten die kürzesten Überlebenszeiten vor. Die schlechte Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben war dabei unabhängig vom vorliegenden Mutationsstatus des *IGHV* (ChiQuadrat 0,4; 1 Freiheitsgrad; $p=0,534$). Die Daten zeigen allerdings, dass auch bei diesen Patienten Rituximab als Teil der Therapie zu einer Verbesserung sowohl des progressionsfreien als auch des Gesamtüberlebens führte. Abb. 15D zeigt, dass durch Rituximab ein statistisch signifikanter Vorteil im progressionsfreien Überleben erreicht werden kann. Die Verbesserung ist allerdings gering, da für die Subgruppe weiterhin eine sehr schlechte Prognose besteht.

Del 17p - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

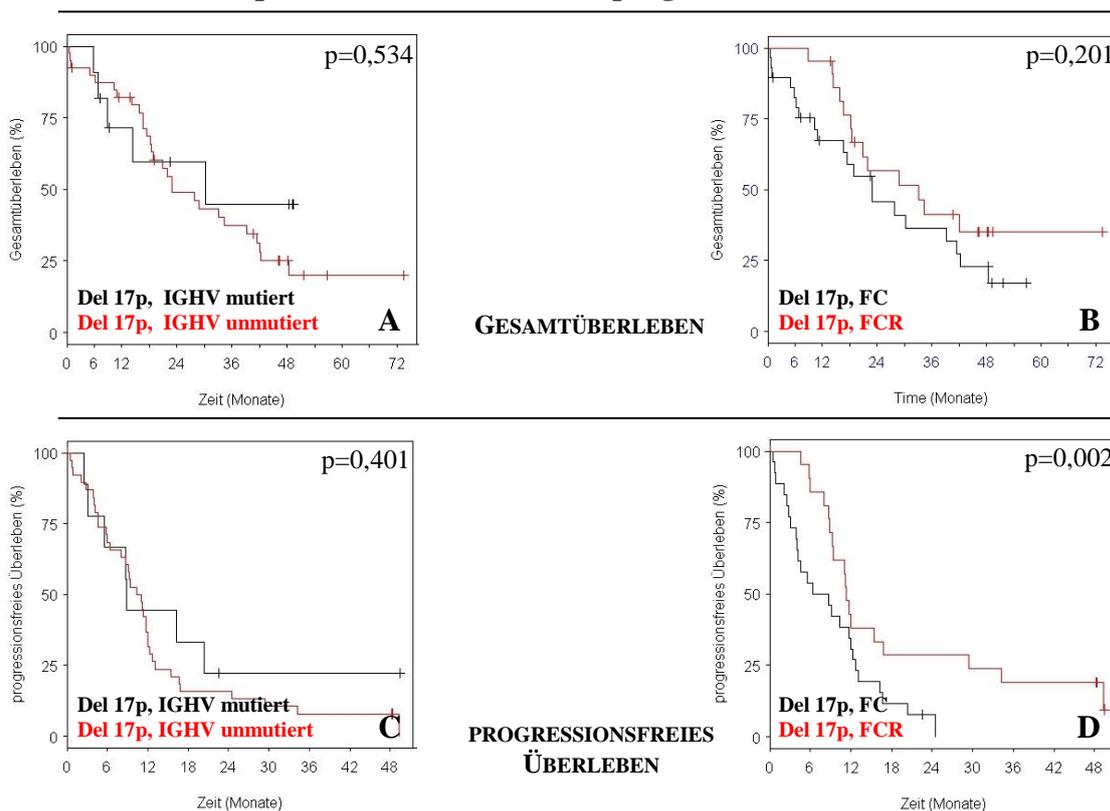


Abbildung 15, A-D:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit Deletion 17p (51 Patienten). **A:** OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), Del: Deletion, 17p: Kurzer Arm des Chromosoms Nr. 17

3.4.2 Deletion 13q

Im Gegensatz zur oben beschriebenen Del 17p ist die Del 13q mit einer deutlich günstigeren Prognose assoziiert. Im untersuchten Kollektiv konnte diese Deletion in 338

Fällen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten 155 Patienten einen mutierten *IGHV*-Status im Gegensatz zu 183 Patienten, die einen unmutierten *IGHV*-Status aufwiesen. Durch ein mutiertes *IGHV* Rearrangement wurde dieser Überlebensvorteil weiter verstärkt. Patienten mit mutiertem *IGHV*, Vorliegen einer Deletion 13q und Immunchemotherapie hatten die längsten medianen Gesamtüberlebenszeiten aller Subgruppen (Abb. 16E)

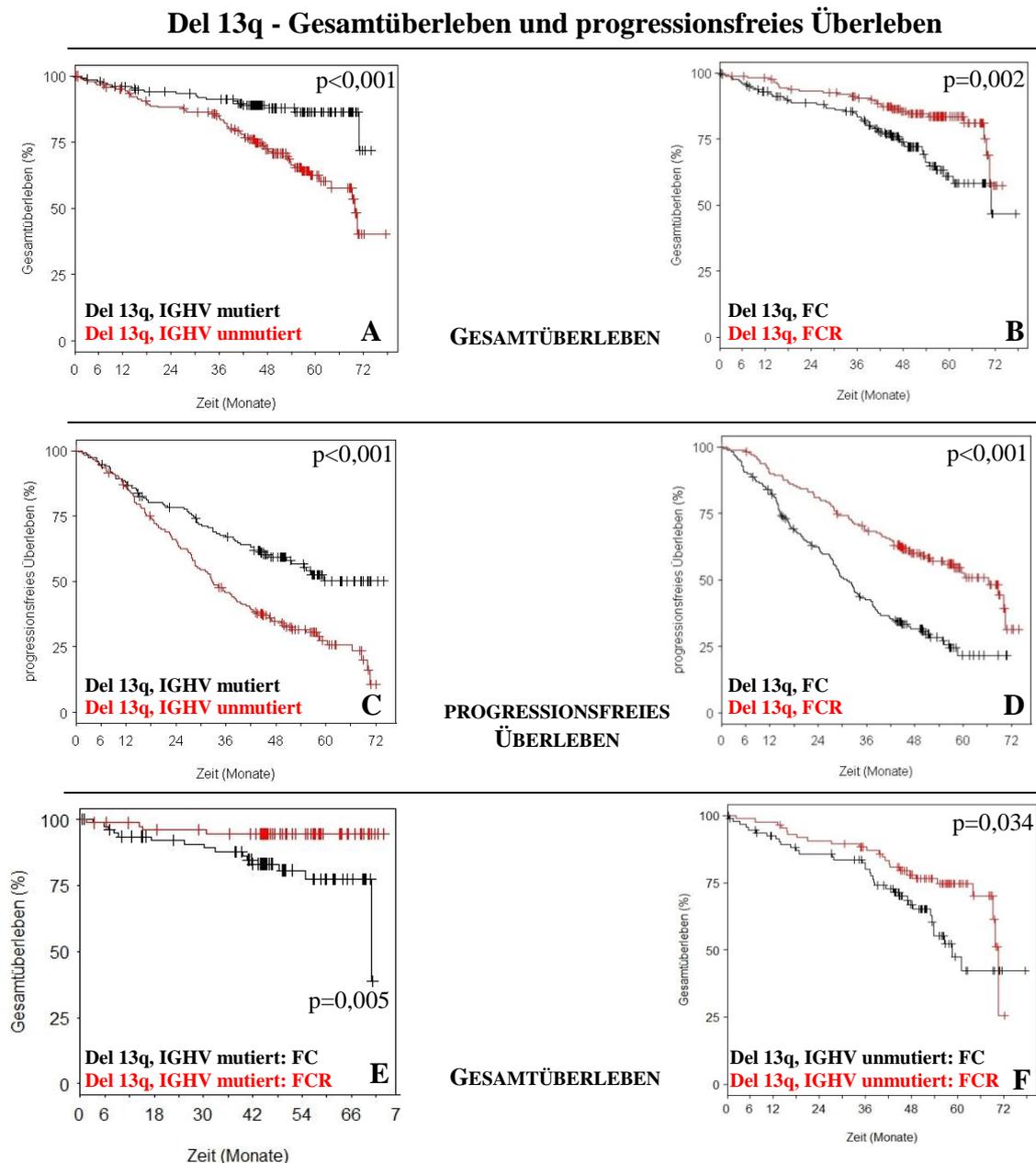


Abbildung 16, A-F:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit Deletion 13q (338 Patienten). **A:** OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, **E:** OS, mutiert FC/FCR, **F:** OS, unmutiert: FC/FCR, *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), Del: Deletion, 13q: Langer Arm des Chromosoms Nr. 13

3.4.3 Deletion 11q

Innerhalb des CLL-8 Kollektivs wurde die Deletion 11q 152mal nachgewiesen und somit am zweithäufigsten. Korreliert mit dem *IGHV* Status konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit *IGHV* mutiert und *IGHV* unmutiert und gleichzeitiger Deletion 11q ausgemacht werden. Die Immunchemotherapie mit FCR zeigte jedoch signifikant bessere Ansprechraten, gemessen am Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben.

Del 11q - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

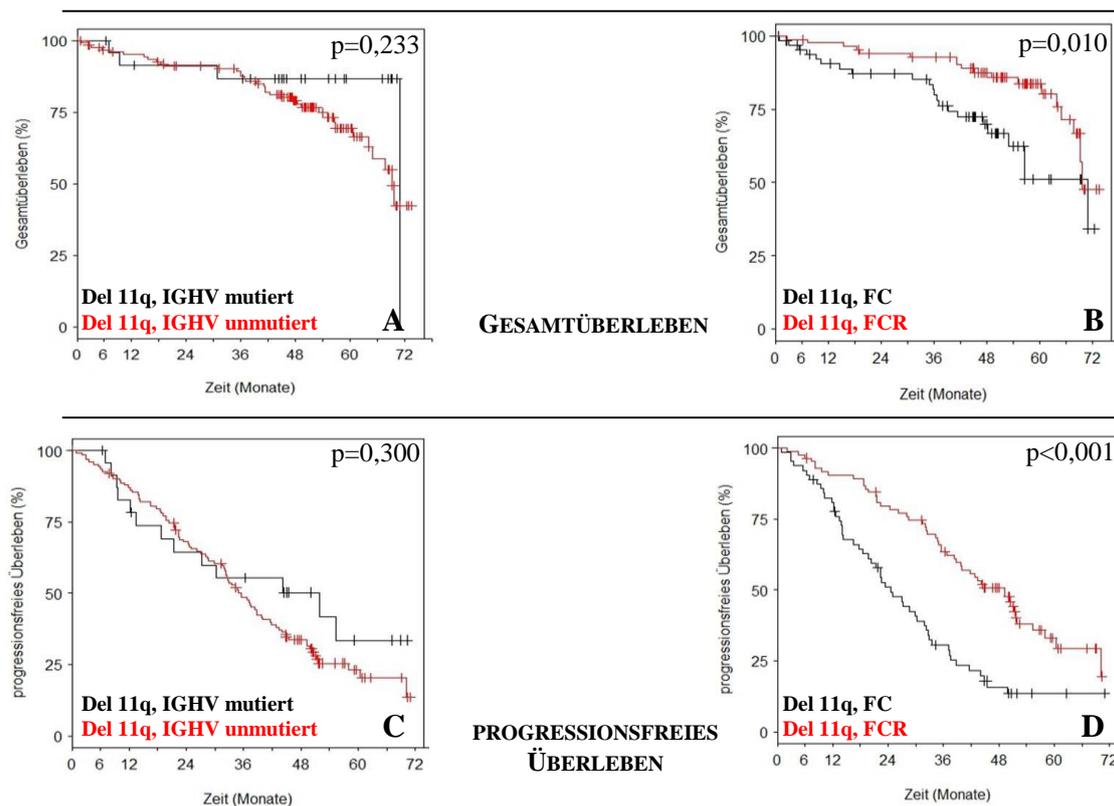


Abbildung 17, A-D:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit Deletion 11q (152 Patienten). **A:** OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR : Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), Del: Deletion, 11q: Langer Arm des Chromosoms Nr. 11

3.4.4 Trisomie 12q

Bei Vorliegen einer Trisomie 12q spielte der *IGHV* Status wiederum eine bedeutende Rolle. Patienten mit mutiertem *IGHV* Gen zeigten signifikant längere Zeiten für OS und

PFS. Die Trisomie 12q wurde insgesamt 70mal nachgewiesen. Entsprechend den Auswertungen zur Deletion 13q erfolgte eine weitere Auftrennung entsprechend des *IGHV* Status. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit mutiertem *IGHV* und Trisomie 12q wurde durch Hinzunahme von Rituximab eine weitere, wenn auch nicht statistisch signifikante Verbesserung erzielt: von den 10 Patienten, auf die diese Konstellation zutraf, waren zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung alle noch am Leben.

Trisomie 12q - Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

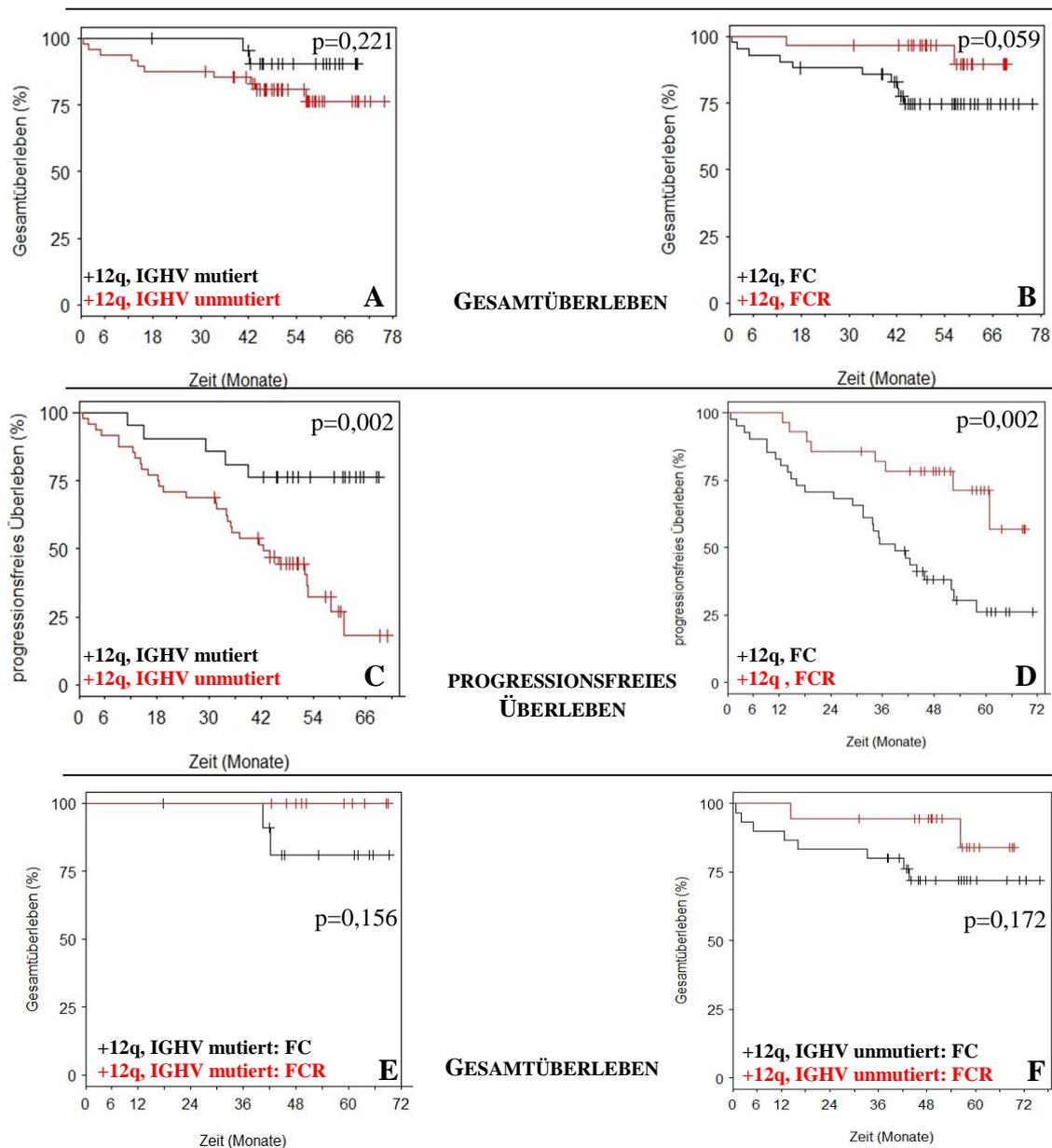


Abbildung 18, A-F:

Analyse der Subgruppe der Patienten mit Trisomie 12 (70 Patienten). **A:** OS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **B:** OS, FC/FCR. **C:** PFS, *IGHV* mutiert/unmutiert, **D:** PFS, FC/FCR, **E:** OS, +12q, *IGHV* mut: FC/FCR, **F:** OS, +12q, *IGHV* unmutiert: FC/FCR, *IGHV*: Variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline, FC: Fludarabin/-Cyclophosphamid, FCR: Fludarabin/-Cyclophosphamid/Rituximab, OS: overall survival (Gesamtüberleben), PFS: progression free survival (progressionsfreies Überleben), +: Trisomie, 12q: Langer Arm des Chromosoms Nr. 12

4. Diskussion

4.1 Prognosefaktoren bei der chronischen lymphatischen Leukämie

Die Identifizierung prognostischer und prädiktiver Marker bei der CLL ist Gegenstand intensiver Forschung. Wegweisend waren die Erkenntnisse zu zytogenetischen und molekulargenetischen Veränderungen (*Döhner et al. 2000, Kröber et al. 2002, Kröber et al. 2006, Zenz et al. 2010, Stilgenbauer et al. 2014*).

4.2 IGHV Status

Mit der Analyse des *IGHV* wurde bereits vor über zehn Jahren ein Marker für die Prognoseabschätzung der CLL identifiziert (*Hamblin et al. 1999, Damle et al. 1999*). Die Untersuchung von inzwischen mehreren tausend Patienten konnte für die Patienten mit mutiertem *IGHV* eine deutlich bessere Prognose ausweisen als für die Patienten mit unmutiertem *IGHV*. Allerdings fehlte lange eine große multizentrisch angelegte Studie mit einem homogenen Patientenkollektiv und einer einheitlichen effektiven Behandlung um die Wertigkeit des *IGHV*-Mutationsstatus weiter bestätigen zu können. Die CLL-8 Studie mit Überlebensdaten von über 800 Patienten, bei denen in 621 Fällen der *IGHV* Status bestimmt wurde, ermöglichte einen repräsentativen Einblick in das Verhalten bzw. den Einfluss bekannter prognostischer Marker in explorativen Analysen unter einer standardisierten und sehr wirksamen Therapie mit FC bzw. FCR.

In vielen internationalen Arbeiten wurden einzelne Subgruppen näher betrachtet. Diese Ergebnisse wurden nun mit den Ergebnissen aus der CLL-8 Studie verglichen.

Das *IGHV* Gen *VH1-69* ist eines der am häufigsten nachzuweisenden Gene und in beinahe allen Fällen unmutiert. Die Prognose dieser Patienten ist auf Grund dieser Tatsache entsprechend schlecht. Im untersuchten Kollektiv lag das mediane Gesamtüberleben bei 44,6 Monaten für die mit Fludarabin/-Cyclophosphamid behandelten Patienten und bei 45,6 Monaten für die mit Fludarabin/-Cyclophosphamid/-Rituximab behandelten Patienten. Da beinahe alle Patienten einen unmutierten *IGHV* Status hatten, sind die Daten mit allen unmutierten *IGHV* Rearrangements zu vergleichen. Hier lag das mediane Gesamtüberleben bei 47,6 Monaten. In einer 2007 erschienenen Publikation wurde gezeigt, dass Patienten mit Nachweis von *VH1-69* keine schlechtere Prognose hatten als alle

anderen Patienten mit unmutiertem *IGHV* Status (*Panovska-Stavridis et al. 2007*). Dieses Ergebnis konnte im CLL-8 Kollektiv bestätigt werden. Der geringe Überlebensvorteil (Gesamtüberleben) war statistisch nicht signifikant ($p=0,619$). Patienten mit mutiertem *VH1-69* zeigten dagegen eine deutlich bessere, mit anderen *IGHV*-mutierten Patienten vergleichbare Prognose. Wie oben beschrieben, ist der Anteil dieser Patienten jedoch sehr gering.

Die Länge der CDR-3 Region war bei mutiertem *IGHV* Status kürzer als bei unmutiertem *IGHV* Status. Dies weist daraufhin, dass das *IGHV* Rearrangement bestimmten Mustern zu folgen scheint. Dieses Phänomen wurde bereits bei *IGHV* Analysen von Patienten mit Mantelzelllymphomen beschrieben (*Kienle et al. 2003*). Eine weitere Aufschlüsselung der Daten entsprechend dem Vorgehen von *Darzentas* und *Stamatopoulos* (*Darzentas et al. 2013*) wäre eine Möglichkeit, um noch weitere und vielleicht bis dato unbekannte Subgruppen zu identifizieren.

Mit zunehmender Verbreitung molekulargenetischer Untersuchungsmethoden sind inzwischen Daten zur *IGHV* Analyse bei Patienten mit CLL aus anderen Teilen der Welt verfügbar. Es zeigten sich hierbei einerseits Ähnlichkeiten, andererseits auch interessante Unterschiede in der Verteilung der *IGHV* Rearrangements. In einer 2013 publizierten kleinen Serie argentinischer CLL Patienten ($n=73$) konnte eine gleiche Häufigkeitsverteilung der *IGHV* Familien wie innerhalb des CLL-8 Kollektivs gefunden werden ($IGHV\ 3 > IGHV\ 1 > IGHV\ 4$) (*Stanganelli et al. 2013*). *VH1-69*, im CLL-8 Kollektiv mit großem Abstand am Häufigsten nachgewiesen (ca. 21 %), war in der argentinischen Kohorte jedoch nur mit knapp 10 % vertreten. Dagegen wurden die Gene *VH2-5*, *VH3-72* und *VH4-59* überdurchschnittlich häufig identifiziert – im CLL-8 Kollektiv nahmen alle drei zusammen lediglich 0,03 % ein. Dies könnte ein Hinweis für die Beteiligung von (noch nicht näher bekannten) Antigenen in der Pathogenese der CLL sein, die in unterschiedlichen geographischen Regionen unterschiedlich verteilt sind.

4.3 Zytogenetische Veränderungen

Die Relevanz zytogenetischer Veränderungen (*Döhner et al. 2000*, *Stilgenbauer et al. 2014*) wurden auch innerhalb des CLL-8 Kollektivs bestätigt. Die Deletion 17p konnte als

eigenständiger ungünstiger, und vor allem von anderen Faktoren unabhängiger Risikofaktor identifiziert werden. Die Prognose ist hier vor allem unabhängig vom *IGHV* Status. Auf Grund der Häufigkeitsverteilung waren aktuell nur die Deletion 13q, Trisomie 12q, Deletion 11q und Deletion 17p untersuchungsrelevant. Die Wertigkeit der Deletion 6q, Trisomie 8q und Trisomie 3q konnte im CLL-8 Kollektiv auf Grund der zu geringen Fallzahlen nicht bestimmt werden. Bisherige Daten (chinesisches Patientenkollektiv) zeigten ein intermediäres Risiko für die Deletion 6q, allerdings ohne eindeutige Korrelation zwischen genetischer Veränderung und Überleben (*Wang et al. 2011*). Zu den genetischen Veränderungen Trisomie 3q und Trisomie 8q existieren keine aktuellen relevanten Publikationen. Die Untersuchung kommender Patientenkollektive auf diese Veränderungen scheinen aufgrund der vergleichsweise geringen Inzidenz weniger zielführend zu sein im Hinblick auf die Risikostratifizierung der CLL und könnten zukünftig in der Diagnostik keine Berücksichtigung mehr finden.

Bei Patienten mit einer Deletion 17p konnte durch eine Chemoimmuntherapie nur eine geringe Verbesserung im PFS erzielt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Hinzunahme von Rituximab zur Chemotherapie die sehr ungünstige Prognose der Patienten mit einer Deletion 17p nicht entscheidend verbessert.

Anders verhält es sich bei den Patienten mit del 13q und mutiertem *IGHV* Status: Rituximab bewirkt hier in der Kombination mit Fludarabin und Cyclophosphamid eine adäquate Kontrolle der Erkrankung mit Verbesserung des Gesamtüberlebens. Die Gruppe der Patienten mit del 11q und +12q profitierten ebenfalls statistisch signifikant von Rituximab.

4.4 Therapiemodalität und Definition des aktuellen Therapiestandards

Die Auswertung der CLL-8 Daten führte zur Zulassung und festen Implementierung von Rituximab in die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie (*Hallek et al. 2010*).

Allerdings profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von einer Therapie nach dem FCR Schema.

Insbesondere für Patienten mit einer Hochrisikokonstellation (Deletion 17p, TP53 Mutation) konnte mit Addition von Rituximab zur Chemotherapie mit Fludarabin und Cyclophosphamid zwar eine geringe Verbesserung, aber kein Durchbruch in der Therapie der CLL erzielt werden (Gesamtüberleben: $p=0,201$). Statistisch signifikant war dagegen der Vorteil beim progressionsfreien Überleben ($p=0,02$).

Ebenso existierte bis heute noch keine gute Therapieoption für Patienten mit einer nach Fludarabin-haltiger Therapie refraktären oder innerhalb von 6 Monaten rezidivierten CLL. Als einzige Option wurde bisher die allogene Stammzelltransplantation gesehen. Die kürzlich veröffentlichten 6-Jahres Follow up Daten der CLL3X Studie der Deutschen CLL Studiengruppe ergaben ein Gesamtüberleben von 58 %, was insgesamt als langfristige Krankheitskontrolle bewertet wurde (*Dreger et al. 2013*). Dem gegenüber stand allerdings die durch die allogene Stammzelltransplantation bedingte erhöhte therapieassoziierte Morbidität und Mortalität (*Dreger et al. 2013*).

Aktuelle Publikationen zeigten bei Hochrisikopatienten einen neuen Therapieansatz mit dem Bruton's Tyrosinkinase (BTK)-Inhibitor Ibrutinib (*Barrientos et al. 2013, Brown 2013, Byrd et al. 2013*), welcher auch für Hochrisiko- Patienten vielversprechend zu sein scheint und bei guter Verträglichkeit sehr hohe Ansprechraten zeigt. Weitere Studien, insbesondere Phase 3 Studien, werden den langfristigen Nutzen der Substanz insbesondere für sog. „Hochrisiko-CLL-Patienten“ beweisen müssen. Das sehr günstige Nebenwirkungsprofil und die einfach Durchführbarkeit mittels oraler Einnahme können aber bereits jetzt als klarer Vorteil in der Behandlung angesehen werden.

Parallel werden Schemata mit weiterentwickelten CD20 Antikörpern, wie Ofatumumab oder Obinutuzumab (GA101) im Hinblick auf potentiell weitere Verbesserung der CLL-Therapie geprüft und in die bestehenden Therapiestandards integriert.

4.5 Einordnung hinsichtlich Verfügbarkeit, Durchführbarkeit, Kosteneffektivität

Die gewählte Methode zur Sequenzierung des *IGHV* Gens ist sowohl relativ zeitaufwendig als auch kostenintensiv. Das Verfahren selbst ist, insbesondere seit Einführung von Kapillarsequenziergeräten anstatt Gelsequenziergeräten, sicher und wenig fehleranfällig durchzuführen. Die Anforderungen an die Patientenprobe sind gering. Hohe Zellzahlen im Blut der Patienten und damit auch hohe DNA Mengen erleichtern die Diagnostik. Findet die Probenabnahme nach Therapiebeginn statt, ist die Durchführung der Methode erschwert. Bei normaler Zellzahl ist eine valide Diagnostik nicht möglich, da ein Überwiegen von klonalen B-Zellen gegenüber polyklonalen normalen B-Zellen für ein valides Ergebnis notwendig ist. In der Präanalytik sind keine spezifischen Lagerungsmaßnahmen notwendig. Die Verarbeitung zum DNA-Pellet sollte schnell und zeitnah erfolgen.

Wünschenswert wäre die Entwicklung von einfacheren Analyseverfahren, die dazu beitragen, die Diagnostik außerhalb von Speziallaboren zu etablieren. Es sollte aber nicht unausgesprochen bleiben, dass inzwischen die Analysezeit vom Eingang der Probe bis hin zum validen Ergebnis in der Regel unter zwei Wochen gehalten werden kann

4.6 Statistik und Fallzahl

Die statistische Auswertung war auf Grund der relativ hohen Fallzahlen prinzipiell mit einem hohen Validitätsgrad verknüpft. Die Patientenzahl war für die Erhebung der primären Studienziele angepasst (PFS, OS des Gesamtkollektivs). Durch Analyse von Subgruppen verringerten sich die Fallzahlen stark, so dass die hier erhobenen Daten eher als explorative, ungeplante Analyse einzustufen sind. An Hand der hier erhobenen Befunde sollen Hypothesen für weitere Untersuchungen generiert werden. Das homogene Kollektiv machte die Daten untereinander gut vergleichbar. Auf Grund der Vielzahl biologischer Subgruppen der CLL ist bei der Initiierung weiterer Studien unbedingt auf eine adäquate Fallzahl und ggf. Stratifikation zu achten, um auch für Subgruppenanalysen eine entsprechende statistische Power zu erreichen.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der Diagnostik der CLL haben die Methode der Mutationsanalyse und die FISH Analyse in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Allerdings benötigen beide Methoden einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand.

Die Untersuchungen der bekannten molekulargenetischen und zytogenetischen Parameter innerhalb eines sehr homogenen Patientenkollektivs führten zu einer noch besseren Abschätzung der Wertigkeit dieser prognostischen Parameter. Allerdings entstehen kleine Subgruppen und die Auswertungen müssen als nicht-vorgeplante Subgruppenanalysen betrachtet werden.

Eine Strategie im stufenweisen, risikoadaptierten Vorgehen anhand auch der molekulargenetischen und zytogenetischen Diagnostik könnte folgendermaßen aussehen:

1. Schritt Diagnosestellung anhand IWCLL Kriterien (*Hallek et al. 2008*)

2. Schritt Feststellung einer Therapieindikation nach den iwCLL-Kriterien. Dabei kann das genetische Risikoprofil zur Festlegung der Verlaufsintervalle und Einschätzung der Prognose hilfreich sein.
3. Schritt Zytogenetische Untersuchung auf Deletion 17p und Erhebung des TP53 Status bei Nachweis der Deletion 17p / TP53 Mutation: keine weiteren Untersuchungen und Therapieeinleitung innerhalb von Studien, möglichst mit innovativen Substanzen
4. Schritt bei fehlender Deletion 17p/-TP53 Mutation: Untersuchung der übrigen zytogenetischen Faktoren (Del 11q, Trisomie 12, Del 13q) sowie Erhebung des *IGHV* Status

Auf Grund der hohen prognostischen Aussagekraft sollte diese Diagnostik auch außerhalb von Studien als Regelleistung angeboten werden.

Im Laufe der nächsten Jahre werden wahrscheinlich neue Pathomechanismen entschlüsselt werden, die hoffentlich zukünftig vielversprechende neue Angriffspunkte für spezifische Therapien liefern werden.

5. Zusammenfassung

Auf Grund des heterogenen klinischen Verlaufs der CLL (chronische lymphatische Leukämie) werden seit Jahren prognostische und therapeutisch relevante, bestenfalls prädiktive Risikofaktoren gesucht. Diese wären wichtig, um den Patienten die bestwirksame und am besten verträgliche Therapie in der jeweiligen Risikosituation anbieten zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung insbesondere des *IGHV*-Rearrangements (*IGHV*= variabler Anteil der schweren Kette der Immunglobuline) und der chromosomalen Aberrationen bei Anwendung einer sehr effektiven Erstlinientherapie innerhalb des sehr gut charakterisierten CLL-8 Studienkollektivs der Deutschen CLL Studiengruppe untersucht. Durch die Auswahl des CLL-8 Studienkollektivs konnte eine in sich sehr homogene Gruppe untersucht werden. Die CLL-8 Studie wurde als internationale, offene, multizentrische, randomisierte Phase-III-Studie entworfen. Verglichen wurden die zwei Therapiemodalitäten Fludarabin/-Cyclophosphamid (FC Arm) gegen Rituximab + Fludarabin/-Cyclophosphamid (FCR Arm) im Rahmen der Primärtherapie. Eine Analyse des *IGHV*-Status konnte in unserem Labor zentral trotz des multizentrischen, internationalen Charakters der Studie bei n=621 Patienten erfolgen. Bei 229 Patienten lag ein mutiertes *IGHV*-Gen vor, bei 390 Patienten ein unmutiertes *IGHV*- Gen.

Es zeigte sich in explorativen, nicht im primären Studiendesign vorgesehenen Analysen in den meisten Subgruppen eine Überlegenheit beim Gesamt- und progressionsfreien Überleben für die Patienten mit mutiertem *IGHV* Status. Allerdings hat der *IGHV* Status ohne gleichzeitige zytogenetische Analysen einen geringeren Stellenwert. Patienten mit der Hochrisikosituation einer Deletion 17p zeigten unabhängig vom *IGHV* Status ein schlechtes Überleben und eine geringe Verbesserung durch Rituximab. Bei Patienten mit einer Deletion 13q wurde Abschätzung der Überlebenszeiten durch Hinzunahme des *IGHV* Mutationsstatus nochmalig verbessert. In Abhängigkeit von der *VH* Familie zeigten sich Unterschiede beim Ansprechen auf Rituximab: bei der häufigen Familie *VH3* war der Effekt der Verlängerung von Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben durch die Chemoimmuntherapie geringer im Vergleich zu den anderen *VH* Familien. Insgesamt muss nochmals betont werden, dass es sich bei diesen Auswertungen um nicht-vorgeplante, explorative Subgruppenanalysen zur Generierung von Hypothesen handelt.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Analyse des *IGHV* Status auch unter einer sehr effektiven Chemo- bzw. Chemoimmuntherapie ihren prognostischen Stellenwert behält. Um Patienten auch außerhalb von Studien der richtigen Therapie zuführen zu können, sollte diese Analyse zusammen mit den zytogenetischen Untersuchungen zur Standarddiagnostik der CLL gehören.

6. Literaturverzeichnis

1. Barrientos J, Rai K. Ibrutinib: a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor with outstanding responses in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 54: 1817-1820, (2013)
2. Bauduer M, Gribben J, Herrmann R, Thiel E, Rai K, Larson R, Ferrara F, Barnard J, Pearce H, Taylor C, Brillant C, Steurer M, Weingart O, Flinn IW, Funkhouser A, Tallman M, Sun Z, Jaksic B, Suciú S, Chevret S, Dighiero G, Leporrier M, Frankel SR, Sirard C, Hillmen P, Trehu B, Felder M, Busch R, Eichhorst B, Hallek M, Stilgenbauer S, Pangalis G, Bezares R, van Oers MH, van Putten W, Gobbi M, Spriano M, Mabed M, Catovsky D, Richards S, Wade R, Abdelhamid T, Dearden C, Knauf W, Blonski J, Jamroziak K, Robak T, Mauro F, Hiddeman W, Johnson SA, Longthorne G, Juliusson G, Pulluqi P, Zinzani PL, Pozzato G, Oncology US, Reynolds C, Furman RR, Durrant J, Elphinstone P, Evans V, Gettins L, Hicks C, James S, Clarke M, MacKinnon L, McHugh TM, Morris P, Read S, Gregory C. Systematic review of purine analog treatment for chronic lymphocytic leukemia: lessons for future trials. *Haematologica* 97: 428 – 436, (2012)
3. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Döhner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai K; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107: 859-861, (2006)
4. Brown JR. A new era of treatment for chronic lymphocytic leukaemia? *Lancet Oncol*. 15: 3-5, (2014)
5. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG, Jones JA, Zhao W, Heerema NA, Johnson AJ, Sukbuntherng J, Chang BY, Clow F, Hedrick E, Buggy JJ, James DF, O'Brien S. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 369: 32-42, (2013)
6. Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJ, Bezares RF, Pettitt AR, Hamblin T, Milligan DW, Child JA, Hamilton MS, Dearden CE, Smith AG, Bosanquet AG, Davis Z, Brito-Babapulle V, Else M, Wade R, Hillmen P; UK National Cancer Research Institute (NCRI) Haematological Oncology Clinical

- Studies Group; NCRI Chronic Lymphocytic Leukaemia Working Group. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 370: 230 – 239, (2007)
7. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100: 4609-4614, (2002)
 8. Chen Z, Wang JH. Generation and repair of AID-initiated DNA lesions in B lymphocytes. *Front Med* (2014), [epub ahead of print]
 9. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 348: 1764-1775, (2003)
 10. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 94: 1840-1847, (1999)
 11. Darzentas N, Stamatopoulos K. The significance of stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 27: 237-250, (2013)
 12. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol*. 81: 181-185, (1989)
 13. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 343: 1910-1916, (2000)
 14. Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. 77 :266-281, (1999)
 15. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 89: 2516-2522, (1997)

16. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E; Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. 21: 12-17, (2007)
17. Dreger P, Döhner H, Ritgen M, Böttcher S, Busch R, Dietrich S, Bunjes D, Cohen S, Schubert J, Hegenbart U, Beelen D, Zeis M, Stadler M, Hasenkamp J, Uharek L, Scheid C, Humpe A, Zenz T, Winkler D, Hallek M, Kneba M, Schmitz N, Stilgenbauer S; German CLL Study Group. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood*. 116: 2438-2447, (2010)
18. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, Böttcher S, Rossi M, Paschka P, Bühler A, Dietrich S, Busch R, Ritgen M, Bunjes D, Zeis M, Stadler M, Uharek L, Scheid C, Hegenbart U, Hallek M, Kneba M, Schmitz N, Döhner H, Stilgenbauer S. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*. 121: 3284-3288, (2013)
19. Dunnick WA, Collins JT, Shi J, Westfield G, Fontaine C, Hakimpour P, Papavasiliou FN. Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J Exp Med*. 206: 2613-2623, (2009)
20. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, Barrientos JC, Zelenetz AD, Kipps TJ, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt AR, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson DM, Miller LL, Li D, Jahn TM, Dansey RD, Hallek M, O'Brien SM. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 370: 997-1007, (2014)
21. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Introna M. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood*. 98: 3383-3389, (2001)
22. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of

- chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111:5446-5456, (2008)
23. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani PL, Caligaris-Cappio F, Seymour JF, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trnety M, Westermann A, Wendtner CM, Eichhorst BF, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S; International Group of Investigators; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 376: 1164 – 1174, (2010)
24. Hallek M, Schmitt B, Wilhelm M, Busch R, Kröber A, Fostitsch HP, Sezer O, Herold M, Knauf W, Wendtner CM, Kuse R, Freund M, Franke A, Schriever F, Nerl C, Döhner H, Thiel E, Hiddemann W, Brittinger G, Emmerich B; German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Fludarabine plus cyclophosphamide is an efficient treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL): results of a phase II study of the German CLL Study Group. *Br J Haematol*. 114: 342-348, (2001)
25. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia. *87*: 49-62, (2008)
26. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Sep 94:1848-1854, (1999)
27. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood*. 95: 2455-2457, (2000)
28. Hsi ED, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Boldt D, Frey T, Loftus M, Hussein MA. Prognostic significance of CD38 and CD20 expression as assessed by quantitative flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 120: 1017-1025, (2003)
29. Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ. Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol*. 158: 235-246, (1997)

30. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 54: 2450-2455, (1984)
31. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, Rai KR. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 99: 3554-3561, (2002)
32. Kienle D, Benner A, Kröber A, Winkler D, Mertens D, Bühler A, Seiler T, Jäger U, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood*, 107: 2090-2093, (2006)
33. Kienle D, Kröber A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TF, Möller P, Benner A, Habermann A, Müller-Hermelink HK, Bentz M, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, 102: 3003-3009, (2003)
34. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 194: 1625-1638, (2001)
35. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, Schlenk RF, Benner A, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 24: 969-975, (2006)
36. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 100: 1410-1416, (2002)
37. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. Evolution and

- impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152: 714-726, (2013)
38. Maul RW, Gearhart PJ. AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol.*105: 159-191, (2010)
39. Maurer C, Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia. *Dtsch Med Wochenschr.*138: 2153-2166, (2013)
40. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 62: 567-575, (1986).
41. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, Parker H, Parker A, Gardiner A, Collins A, Else M, Cross NC, Catovsky D, Strefford JC. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood.* 17: 468-475, (2013)
42. Park SR, Zan H, Pal Z, Zhang J, Al-Qahtani A, Pone EJ, Xu Z, Mai T, Casali P. HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol.* 10: 540-550, (2009)
43. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood.* 99: 1314-1319, (2002)
44. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, Scharff MD. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 26: 481-511, (2008)
45. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío JM, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjosé S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E. Whole-genome sequencing

- identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 475: 101-105, (2011)
46. Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués JM, Barrena S, Sánchez ML, Teodosio C, Giraldo P, Giralt M, Pérez MC, Romero M, Perdiguer L, Orfao A. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 74: 139-149, (2008)
47. Rosenquist R, Lindström A, Holmberg D, Lindh J, Roos G. V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur J Haematol*. 62: 123-128, (1999)
48. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 194:1639-1647, (2001)
49. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Ríos A, Prados D, Morey M, Gomis F, et al. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood*. 64: 642-648, (1984)
50. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 333: 1052-1057, (1995)
51. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Bühler A, Winkler D, Cazzola M, Döhner K, Edelmann J, Mertens D, Kless S, Mack S, Busch R, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood*, 7: 1266-1270, (2013)
52. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J, Küppers R. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 19: 2183-2198, (2012)
53. Stanganelli C, Travella A, Bezares R, Slavutsky I. Immunoglobulin gene rearrangements and mutational status in argentinian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*: 13: 447-457, (2013)

54. Stilgenbauer S, Döhner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med.* 347: 452-453, (2002)
55. Stilgenbauer S, Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia. Treatment and genetic risk profile. *Internist* 54: 166-170, (2013)
56. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, Bühler A, Böttcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jäger U, Patten N, Wu L, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner CM, Fink AM, Fischer K, Busch R, Hallek M, Döhner H. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood.* (2014), [Epub ahead of print]
57. Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, Diviné M, Leblond V, Corront B, Leprêtre S, Eghbali H, Van Den Neste E, Michallet M, Maloisel F, Bouabdallah K, Decaudin D, Berthou C, Brice P, Gonzalez H, Chapiro E, Radford-Weiss I, Leporrier N, Maloum K, Nguyen-Khac F, Davi F, Lejeune J, Merle-Béral H, Leporrier M; for the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and Groupe Français d'étude de la Leucémie Lymphoïde Chronique (GFLLC). Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood.* 117: 6109-6119, (2011)
58. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, Merup M, Juliusson G, Vilpo J, Enblad G, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood.* 101: 4952-4957, (2003)
59. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca DS, Zhang L, Zhang W, Vartanov AR, Fernandes SM, Goldstein NR, Folco EG, Cibulskis K, Tesar B, Sievers QL, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub TR, Lander ES, Neuberger D, Brown JR, Getz G, Wu CJ. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 29: 2497-2506, (2011)
60. Wang YH, Fan L, Xu W, Li JY. Detection methods of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Exp Med.* 12: 69-77, (2011)

61. Zan H, Casali P. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity*, 16: 83-101, (2013)
62. Zanotti R, Frattini F, Ghia P, Visco C, Zamò A, Perbellini O, Stella S, Facco M, Giaretta I, Chilosi M, Pizzolo G, Ambrosetti A. ZAP-70 expression is associated with increased risk of autoimmune cytopenias in CLL patients. *Am J Hematol.* 85: 494-498, (2010)
63. Zenz T, Häbe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Bühler A, Sarno A, Groner S, Mertens D, Busch R, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 114: 2589-2597, (2009)
64. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 10: 37-50, (2010)
65. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, Helfrich H, Heuberger M, Hoth P, Fuge M, Denzel T, Häbe S, Malcikova J, Kuglik P, Truong S, Patten N, Wu L, Oscier D, Ibbotson R, Gardiner A, Tracy I, Lin K, Pettitt A, Pospisilova S, Mayer J, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S; European Research Initiative on CLL (ERIC). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, 12: 2072-2079, (2010)
66. Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol.* 25: 42-59, (1998)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Hartmut Döhner vielen Dank für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit an der von ihm geleiteten Abteilung für Innere Medizin III am Universitätsklinikum Ulm erstellen zu können.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Stephan Stilgenbauer für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die engagierte wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labore der Abteilung Innere Medizin III, namentlich Frau Sabrina Kless und Frau Alexandra Brodbeck für die technische Unterweisung und Hilfsbereitschafts sowie für deren exzellente Laborarbeit.

Vielen Dank an Herrn Dr. Andreas Bühler für die intensive Unterstützung.

Ich bedanke mich herzlichst bei meinen Eltern Hannelore und Manfred Schönsteiner für all ihre Unterstützung.

Vielen lieben Dank an meine Frau Dorothee für wichtige Anregungen und ihre geduldige und motivierende Unterstützung.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt