

III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Christian Peschel)

**Untersuchung der Frequenz und des prognostischen
Einflusses verschiedener IGHV-Subtypen bei Patienten mit
chronisch lymphatischer Leukämie (CLL)**

Dominik Johannes Walter Wohlrab

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst Rummeny

Prüfer der Dissertation: Prof. Dr. Wolfgang Kern
Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 09.01.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.03.2018.angenommen.

Meiner Frau Silvia sowie
meinen Kindern Antonia und Johannes
in liebevoller Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	06
1.1 Einführung	06
1.2 Diagnosestellung	07
1.3 Prognosemarker	09
1.3.1 Serummarker	09
1.3.2 Zytogenetische Veränderungen	09
1.3.3 <i>IGHV</i> -Status	10
1.3.4 Immunophänotypisierung	11
1.4 Stadieneinteilung	11
1.5 Prinzipien der Therapie	12
1.6 Diagnostik bei der CLL	15
1.7 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Patientenproben	17
2.2 Zytogenetik	17
2.2.1 Technik der Chromosomenanalyse	17
2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	19
2.3.1 Interphase FISH	20
2.3.2 Andere FISH-Techniken in der Hämatologie	20
2.3.3 Funktionsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	20
2.3.4 Die hier im Speziellen angewandte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	21
2.4 <i>IGHV</i> -Mutationsstatus	21
2.4.1 Technik der <i>IGHV</i> -Analyse	22
2.5 Immunophänotypisierung	23
2.6 Funktionsweise eines Durchflusszytometers	23
2.6.1 Durchflusszytometrische Analysen in dieser Arbeit	24
2.7 Statistik	26
2.8 Grundlagen dieser Arbeit	26

3. Ergebnisse	27
3.1 <i>IGHV</i> -Subtypen	27
3.1.1 Häufige <i>IGHV</i> -Subtypen	28
3.1.2 Zytogenetische Veränderungen in der Gesamtkohorte	30
3.1.3 Geschlechtsverteilung bei einzelnen <i>IGHV</i> -Subtypen	31
3.1.4 Zytogenetische Veränderungen in der Gesamtkohorte	33
3.2 Verteilung der <i>IGHV</i> -Subtypen in den verschiedenen zytogenetischen Subgruppen	34
3.2.1 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit 13q-Deletion	34
3.2.2 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit 13q-Deletion als einziger Aberration	34
3.2.3 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit Trisomie 12	34
3.2.4 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit 11q-Deletion	35
3.2.5 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit 17q-Deletion	35
3.2.6 <i>IGHV</i> -Subtypen bei Patienten mit IGH-CCND1-Rearrangement	35
3.3. Klinische Bedeutung der unterschiedlichen -Subtypen	35
3.3.1 VH1-2	38
3.3.2 VH1-18	38
3.3.3 VH1-3	38
3.3.4 VH1-46	38
3.3.5 VH1-69	38
3.3.6 VH3-1	38
3.3.7 VH3-21	39
3.3.8 VH3-23	39
3.3.9 VH3-30	39
3.3.10 VH3-33	39
3.3.11 VH3-48	39
3.3.12 VH3-7	39
3.3.13 VH3-72	39
3.3.14 VH3-74	39
3.3.15 VH4-34	40

3.3.16 VH4-39	40
3.3.17 VH4-4	40
3.3.18 VH4-59	40
3.4. <i>IGHV</i> -Gruppen mit besonders kurzer TTT (time to treatment)	40
3.5. <i>IGHV</i> -Gruppen mit besonders langer TTT (time to treatment)	40
3.6. Ausgeprägter Unterschied der TTT (time to treatment) einer <i>IGHV</i> -Gruppe im Vergleich mit der restlichen Gesamtkohorte	41
3.6.1 VH1-46	41
3.6.2 VH4-39	41
3.6.3 VH4-4	41
3.6.4 VH3-11	41
3.7. Einfluss von <i>IGHV</i> -Subgruppen auf die TTT bei Patienten mit mutiertem <i>IGHV</i> -Status	41
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	50
6. Tabellenverzeichnis	52
7. Abbildungsverzeichnis	53
8. Literaturverzeichnis	54
9. Danksagung	62
10. Eidesstattliche Erklärung	63

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) wird nach der Weltgesundheitsorganisations-Klassifikation hämatologischer Neoplasien [WHO, 2008] als leukämisch verlaufende reife B-Zell-Neoplasie definiert, welche durch eine klonale Proliferation und Akkumulation von B-Lymphozyten im peripheren Blut, Knochenmark sowie weiteren lymphatischen Organen wie Milz oder Lymphknoten charakterisiert ist. Es handelt sich dabei um die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 2-6/100.000 pro Jahr ansteigend auf 12.8/100.000 pro Jahr in der Altersgruppe der ≥ 65 -Jährigen [Swerdlow et al., 2008]. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 65 bis 70 Jahren [Hallek et al., 2008]. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird als unterer Grenzwert für die Diagnosestellung der Nachweis von mindestens $5,0 \times 10^9/l$ CLL-Zellen im peripheren Blut verlangt; allerdings kann bei entsprechenden Symptomen auch bei einer geringeren Zahl klonaler B-Zellen die Diagnose gestellt werden [Swerdlow et al., 2008].

Die Ätiologie der CLL ist unbekannt. Da jedoch für die Kinder von Patienten mit einer CLL ein signifikant erhöhtes Risiko besteht, ebenfalls im späteren Leben an einer CLL zu erkranken, scheinen genetische Faktoren eine Rolle zu spielen. Auch finden sich im familiären Umfeld von Patienten mit einer CLL vermehrt Patienten mit einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL), definiert als Nachweis von weniger als $5,0 \times 10^9/l$ CLL-Zellen im peripheren Blut. Viele Patienten mit einer CLL sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung asymptomatisch und fallen nur durch eine Leuko- bzw. Lymphozytose im Rahmen einer Routineuntersuchung auf. Vermutlich im Rahmen intensivierter ärztlicher Kontrollen sowie einer verbesserten Aufmerksamkeit für Blutbildauffälligkeiten steigt der Anteil unter den CLL-Patienten an, bei welchen die CLL im Rahmen einer Routineuntersuchung festgestellt wird: im Jahre 1991 wurde dies für etwa 30%, im Jahre 1994 für etwa 60% und im Jahre 2004 sogar für 75-80% der Patienten berichtet [Hallek et al, 2009].

Die Symptome bei einer CLL resultieren beispielsweise aus einer Anämie (entweder bedingt durch die Verdrängung der Erythropoese im Knochenmark oder durch eine Autoimmunhämolyse, eventuell in Zusammenhang mit einer Autoimmunthrombozytopenie). In ca. 25% kommt es zur Diagnosestellung aufgrund der vermehrten Infektanfälligkeit; etwa 20% der Patienten berichten von einer B-Symptomatik (Fieber,

Nachtschweiß, Gewichtsverlust). Selten wird die Diagnose einer CLL aufgrund von Hautinfiltrationen oder Blutungen gestellt [Rai et al., 1990]. Weitere Symptome sind eine Lymphadenopathie, eine Splenomegalie, eventuell auch eine Hepatomegalie. Durch ein Antikörpermangelsyndrom bzw. eine Knochenmarksinsuffizienz können auch schwere und mitunter lebensbedrohliche Infektionen auftreten. Neben bakteriellen Infekten sind opportunistische Infektionen durch Herpesviren, Cytomegalievirus, Mykobakterien, Listerien oder Pneumocystis jirovecii zu nennen [Gribben, 2010]. Gelegentlich werden Hautsymptome wie Pruritus, chronische Urtikaria und chronische Erythrodermie beobachtet. Im weiteren Verlauf kann die CLL jedes Organ infiltrieren.

Klinisch sind die Verläufe der CLL sehr heterogen [Hallek et al., 2009]. Das mediane Überleben variiert zwischen 2 und 20 Jahren.

Die Therapieansätze sind je nach Stadium sehr unterschiedlich. In der Regel gilt, dass asymptomatische Patienten im Stadium Rai 0 bzw. Binet A (Tab. 3 und 4) regelmäßig im Verlauf untersucht werden sollten; eine Therapie wird meist erst bei Krankheitsprogression notwendig. CLL-Patienten im Stadium Rai I – IV bzw. Binet B/C haben hingegen zumeist einen Vorteil von einer rechtzeitig durchgeführten Behandlung [Hallek et al., 2008]. Die Prognosen im Stadium Binet A bzw. Rai 0 sind günstig. Viele dieser Patienten benötigen neben der Überwachung keine Therapie. Die überwiegende Anzahl der Patienten in intermediären oder Hochrisiko-Stadien sprechen zunächst auf die Therapie an, bevor es zu einer Krankheitsprogression oder zu einer Transformation in ein hochmalignes Lymphom (Richter-Syndrom) kommt [Hoffbrand et al., 2003].

1.2 Diagnosestellung

Die Diagnose einer CLL wird anhand der Immunphänotypisierung durch den Nachweis von ≥ 5.000 monoklonalen B-Lymphozyten/ μl mit CLL-typischem Immunphänotyp im peripheren Blut gestellt. Im Blutausstrich findet man charakteristischerweise kleine reifzellige Lymphozyten mit einem schmalen Zytoplasmaraum und einem kondensiertem Zellkern. Gelegentlich finden sich zwischen diesen reifzelligen Lymphozyten sogenannte Prolymphozyten. Bei einem Anteil von $\geq 55\%$ wird von einer Prolymphozytenleukämie (B-PLL) gesprochen. Ferner lassen sich Gumprecht'sche Kernschatten (fragile, im Ausstrich zerquetschte Lymphozyten) nachweisen, was zwar typisch, nicht aber spezifisch für die CLL sind [Hallek et al., 2008]. In der histologischen Knochenmarksuntersuchung fällt ebenfalls eine deutliche Vermehrung reifer Lymphozyten auf. Ein nodulärer Knochenmarksbefall wies in früheren Analysen auf eine bessere Prognose als ein diffuser

Knochenmarksbefall hin. Dieser Parameter ist jedoch angesichts neuerer Prognoseparameter in den Hintergrund getreten [Geisler et al., 1997].

Zur Diagnose einer CLL werden durchflusszytometrisch die Oberflächenantigene der B-Lymphozyten untersucht. Typisch für die CLL ist das gleichzeitige Vorkommen des T-Zell-Antigens CD5 sowie der B-Zell-Oberflächenantigene CD19, CD20 und CD23. CD79b und CD22 werden schwach exprimiert [Hallek M. et al.; 2008 c]. Es besteht eine schwache Expression von Oberflächen-Immunglobulin mit einer klonalen Leichkettenrestriktion. Die für die CLL typische Expression von CD23 erlaubt die Differenzierung vom Mantelzelllymphom, welches außerdem Oberflächen-Immunglobulin stark exprimiert. Bei der PLL ist die Expression von CD5 nur schwach oder gar nicht vorhanden und der Phänotyp weniger spezifisch als bei typischer CLL [Matutes et al., 1994]. Der sogenannte „Matutes-Score“ erlaubt es, mit großer Wahrscheinlichkeit die Diagnose einer CLL zu stellen. Dieser auf der Immunphänotypisierung basierende Score verdeutlicht, dass kein einzelner Marker ausreicht, um eine CLL zu diagnostizieren [Kern et al., 2005], sondern dass mehrere durchflusszytometrische Marker in Kombination betrachtet werden müssen.

Tab. 1 : Matutes-Score für die B-CLL [Moreau et al., 1997; Ginaldi L. et al., 1998]

Charakteristika der B-CLL	Expression
CD5	+
CD23	+
FMC7	-
sIgM	(+)
sCD22 oder CD79b	(+)

+ = starke Expression; (+) = schwache Expression; - = keine Expression;
s = Expression auf der Zelloberfläche („surface“)

Ferner gilt es, Fälle einer CLL von einer monoklonalen B-Zell-Lymphozytose (MBL) abzugrenzen. Die MBL ist definiert als das Vorhandensein von weniger als $5,0 \times 10^9$ monoklonalen B-Zellen/L im peripheren Blut, wobei der Immunphänotyp identisch zur CLL ist. Ferner dürfen bei einer MBL keine Lymphom-assoziierten Symptome vorhanden sein [Marti et al., 2005 a]. Nach einer aktuellen Studie von Vardi et al. kann die MBL in eine

„low-count MBL“ ($<0,5 \times 10^9$ monoklonale B-Zellen/L im peripheren Blut) sowie eine „high-count MBL“ ($\geq 0,5 \times 10^9$ monoklonale B-Zellen/L im peripheren Blut) unterteilt werden. Weiters konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass der absoluten Leukozytenzahl bei Patienten mit einer MBL ein prognostischer Wert zukommt. Im Rahmen der o.g. Studie war es in 34 Folgemonaten bei der „low-count MBL“ zu keiner Transformation in eine CLL gekommen, im Gegensatz dazu lag das Risiko einer Transformation einer „high-count MBL“ in eine CLL bei 1-4%/Jahr [Vardi et al., 2013]. Zusammengefasst kommt es in 1-2% der Fälle zur Transformation einer MBL in eine CLL [Hallek et al., 2008]. Verschiedene Studien zeigten, dass Patienten mit einer monoklonalen B-Zellvermehrung entsprechend den Kriterien einer MBL über lange Zeiträume stabile Verläufe zeigten, ohne dass es zu klinischen Symptomen kam [Cartwright, 1997; Marti et al., 1997; Sarasua et al., 1997; Vogt et al., 1997]. Allerdings ist die Detektion einer MBL bzw. die Sensitivität für die Entdeckung der monoklonalen B-Zellen auch von den jeweils verwendeten Assays abhängig. Die Prävalenz einer MBL beträgt insgesamt für das Erwachsenenalter 0,5 - 1 %, ab dem 60. Lebensjahr beträgt die Inzidenz sogar über 5 % [Marti et al., 2005 b].

1.3 Prognosemarker

Aufgrund der heterogenen klinischen Verläufe bei Patienten mit CLL kommt der Bestimmung von prognostisch relevanten Parametern eine große Rolle zu.

1.3.1 Serummarker

Zum einen haben sich Serummarker wie Beta-2-Mikroglobulin und Thymidinkinase etabliert. Die erhöhte Thymidinkinase korreliert mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium sowie mit kürzerem Gesamtüberleben und kürzerem progressionsfreien Intervall [Hallek et al., 1999]. Weiters konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte CD23 Level mit einem schnelleren Krankheitsfortschritt korrelieren [Hallek et al., 1999]. Auch erhöhte Beta-2-Mikroglobulin-Konzentrationen korrelieren mit einem erhöhten Progressionsrisiko.

1.3.2 Zytogenetische Veränderungen

Bei einem Großteil der Patienten mit CLL sind anhand der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (einer molekular-zytogenetischen Methode) zytogenetische Veränderungen detektierbar, welchen eine hohe prognostische Relevanz zukommt. Diese Untersuchungen werden meist an Interphasekernen durchgeführt und bedürfen im

Gegensatz zur Chromosomenbänderungsanalyse keiner vitalen und proliferierenden Zellen [Döhner et al., 2000]. Die häufigste zytogenetische Aberration bei der CLL ist eine Deletion am langen Arm des Chromosoms 13 [del(13q14)], gefolgt von einer Trisomie 12, 11q-Deletion [del(11q22-23)], 6q-Deletion [del(6q21)], und 17q-Deletion [del(17p13)]. Allerdings ist die Detektion der entsprechenden zytogenetischen Veränderungen auf die FISH-Sonden begrenzt, welche unmittelbar eingesetzt werden. Somit ist das Spektrum der identifizierbaren Veränderungen begrenzt. Die Chromosomenbänderungsanalyse ermöglicht hingegen die Abbildung des gesamten Chromosomensatzes und liefert zusätzliche prognostische Information [Haferlach et al., 2010].

In einer Arbeit von Döhner et al. wiesen Patienten mit einer 17p-Deletion, welche weitgehend mit einer Deletion des Tumorsuppressorgens *TP53* korreliert, eine ungünstige Prognose mit einem medianen Überleben von nur 32 Monaten auf. Patienten mit einer 11q-Deletion hatten ein medianes Überleben von 79 Monaten. Hingegen war die Prognose von Patienten mit einer Trisomie 12 oder einem normalem Karyotyp mit einem medianen Überleben von 114 und 111 Monaten deutlich besser. Die beste Prognose wiesen Patienten mit einer isolierten 13q-Deletion mit einer medianen Überlebenszeit von 133 Monaten auf [Döhner et al., 2000].

1.3.3 *IGHV*-Status

In der Ausreifung lymphatischer Zellen treten Rearrangements in den Genen auf, welche die schweren Ketten der Immunglobuline (*IGHV*) bilden. Hierbei können Mutationen in der variablen Region der Immunglobuline auftreten. In Abhängigkeit des *IGHV* Mutationsstatus können CLL-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in Patienten mit einem unmutiertem *IGHV*-Status entsprechend einem Präkeimzentrumslymphom sowie Patienten mit einem mutiertem *IGHV*-Status, die mehr als 98% Homologie zur Keimbahnsequenz aufwiesen, entsprechend einem Postkeimzentrumslymphom [Döhner et al., 2000]. Patienten mit unmutiertem *IGHV*-Status haben ein kürzeres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben als Patienten mit einem mutierten *IGHV*-Status. Die in der Immunphänotypisierung gemessene erhöhte Expression der Tyrosinkinase ZAP-70 oder des Antigens CD38 auf den CLL-Zellen korreliert mit einem unmutierten *IGHV*-Status. Als zusätzliches Beispiel für Assoziationen zwischen den verschiedenen Parametern sei das gleichzeitige Auftreten von 11q- sowie 17p-Deletionen, welche mit einer ungünstigen Prognose korrelieren, in Kombination mit einem unmutierten *IGHV*-Status genannt, welcher ebenfalls prognostisch ungünstig ist [Stilgenbauer et al.,

2000]. Der *IGHV*-Mutationsstatus wird anhand der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Sequenzierung bestimmt.

1.3.4 Immunphänotypisierung

Orchard et al. zeigten, dass sich bei 75% der Patienten mit ZAP-70-Überexpression eine Korrelation mit einem unmutierten *IGHV*-Status fand [Orchard et al., 2004]. In einer Studie von Crespo et al. konnte bei 88% der Patienten ohne Überexpression von ZAP-70 eine Korrelation mit einem mutierten *IGHV*-Status nachgewiesen werden [Crespo et al., 2003]. Weiterhin zeigten beide Studien [Orchard et al., 2004; Crespo et al., 2003], dass eine Überexpression von ZAP-70 mit einer verminderten „time to treatment“ bzw. mit einem geringeren behandlungsfreien Zeitintervall sowie einem kürzeren Überleben korrelierte. In einer Studie von Ibrahim et al. korreliert die Expression von CD38 mit einem unmutierten *IGHV*-Status und wird als prognostischer Indikator aufgrund seiner unkomplizierten Nachweisbarkeit im peripheren Blut für Patienten mit einer CLL empfohlen [Ibrahim et al., 2001]. Nicht geklärt ist jedoch, ob der unmutierte *IGHV*-Status selbst oder dessen Korrelation mit anderen Parametern (wie CD38 oder ZAP-70 Expression) für die ungünstige Prognose verantwortlich ist [Hallek et al., 2008]. Sorour et al. berichteten, dass sowohl Patienten mit positivem ZAP-70-Status als auch jene mit einem positiven CD38-Status eine höhere Anzahl an Lymphozyten im peripheren Blut aufwiesen als ZAP-70- und CD38-negative Patienten. Ferner befanden sich 66,6% der ZAP-70 und CD38 positiven unbehandelten Patienten in den fortgeschrittenen Stadien III-V nach Rai im Gegensatz zu einem Anteil von nur 26,3% bei den ZAP-70 und CD38-negativen Patienten [Sorour et al., 2007]. Somit sind sowohl ZAP-70 als auch CD38 in der Immunphänotypisierung wichtige prognostische Marker für Patienten mit CLL.

1.4 Stadieneinteilung

Die Einteilung der Patienten mit einer CLL in klinische Stadien erfolgt nach der Binet- oder der Rai-Klassifikation. Wesentliche Parameter in diesen Klassifikationssystemen sind neben peripheren Blutwerten (Hämoglobinkonzentration und Thrombozytenzahl) die Anzahl der vergrößerten Lymphknotenregionen, ferner eine Hepato- und Splenomegalie.

Die beiden Klassifikationssysteme sind in Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 2: Risikostratifizierung nach Binet [Rai et al.; 1990]

Stadium	Merkmale
A	<3 vergrößerte Lymphknotenregionen, Hb \geq 10,0 g/dl, Thrombozyten \geq 100.000/ μ l
B	\geq 3 vergrößerte Lymphknotenregionen, Hb \geq 10,0 g/dl, Thrombozyten \geq 100.000/ μ l
C	Hb <10,0 g/dl und/oder Thrombozytopenie <100.000/ μ l

Tab. 3: Rai-Klassifikation [Binet et al.; 1981]

Stadium	Merkmale
0	reine Lymphozytose
I	+ Lymphknotenvergrößerung
II	+ Hepato- und Splenomegalie
III	+ Anämie mit Hb <11 g/dl
IV	+ Thrombozytopenie <100.000/ μ l

1.5 Prinzipien der Therapie

Die Kriterien zur Durchführung der Therapie bei Patienten mit CLL hängen vom Krankheitsverlauf und vom aktuellen Krankheitsstadium ab. In der Regel wird ein Patient im Frühstadium (z.B. Binet A) nur beobachtet und erst bei einer Krankheitsprogression behandelt. Eine Therapie mit Alkylantien im Frühstadium schien in zahlreichen Studien nicht zu einer Verlängerung des Überlebens zu führen. CLL-Patienten mit symptomatischer oder progressiver Krankheit profitieren hingegen von einer Behandlung.

Nach den Leitlinien einer Internationalen Arbeitsgruppe („14. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia“) gelten die in der Tabelle 4 aufgeführten Parameter als Indikationen für den Therapie-Beginn bei Patienten mit CLL. Beispielhaft sind hier das

Auftreten von Anämie oder Thrombozytopenie, eine symptomatische Splenomegalie, massive Lymphknotenschwellungen, eine zunehmende Lymphozytose sowie B-Symptomatik zu nennen.

Tab. 4: Indikationen zur Therapie bei Patienten mit einer CLL [Lozanski et al., 2004] nach dem „International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia“ (IWCLL) 1997

1. Knochenmarkversagen mit Entwicklung oder Verschlechterung einer Anämie oder Thrombozytopenie
2. Erhebliche, zunehmende oder symptomatische Splenomegalie (mindestens 6 cm unter dem linken Rippenbogen)
3. Massive Lymphadenopathie (Mindestdurchmesser 10 cm), zunehmende oder symptomatische Lymphadenopathie
4. Zunehmende Lymphozytose mit einem Anstieg von mehr als 50% innerhalb von 2 Monaten oder eine Lymphozytenverdoppelungszeit (LDT = lymphocyte doubling time) von weniger als 6 Monaten
5. Autoimmunhämolytische Anämie und/oder Autoimmun-Thrombozytopenie mit schlechtem Ansprechen auf Kortikosteroide oder eine andere Standardtherapie
6. Krankheitsbedingte Symptome <ul style="list-style-type: none"> a.) Gewichtsverlust >10% des Körpergewichts innerhalb der letzten 6 Monate b.) Signifikante Leistungsminderung c.) Fieber >38.0°C für 2 Wochen oder mehr ohne Infekt d.) Nachtschweiß >1 Monat

Die Frage und Wahl der Therapie hängt auch vom Alter des Patienten sowie seiner Komorbidität ab. Schwierig ist die Festlegung des richtigen Zeitpunkts des Therapiebeginns. Selbst in den höheren Stadien nach Rai und Binet kann mitunter eine abwartende Haltung von Vorteil sein. Die Therapieoptionen sind mannigfaltig. Neben der klassischen Chemotherapie stehen immuntherapeutische Ansätze, für ganz seltene Fälle auch eine allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung [Molica et al., 1999; Mauro et al, 1999].

Als zytostatische Substanz wird oftmals Chlorambucil aus der Gruppe der Alkylantien eingesetzt. Problematisch kann die Myelotoxizität sein [Sawitsky et al., 1977]. Chlorambucil kann auch mit Prednisolon kombiniert werden („Knospe Schema“) [Sawitsky et al., 1977] und stellte über lange Jahre den Therapiestandard dar. Weitere eingesetzte Alkylantien sind Cyclophosphamid sowie Bendamustin [Anger et al., 1975]. Bendamustin

wird heute in Kombination mit Rituximab als first-line Therapie bei CLL-Patienten ohne TP53 Deletion sowie bei CLL-Patienten, bei welchen eine Therapie mit Fludarabin / Rituximab aufgrund der hohen Toxizität nicht in Frage kommt, eingesetzt [Johnson et al., 2014].

Eine andere Wirkstoffgruppe sind Purinanaloga. Hier ist bei der Therapie der CLL vor allem Fludarabin zu nennen. Es wurden hohe Ansprechraten bis zu knapp 80% berichtet. [Keating et al., 1998]. Der Vergleich verschiedener Kombinationstherapien (siehe Tab. 5) mit Fludarabin als Monotherapie hat ergeben, dass höhere Remissionsraten und eine längere progressionsfreie Zeit unter Kombinationstherapien zu erreichen waren, jedoch kein signifikanter Überlebensvorteil erzielt wurde [Keating et al., 1998].

Tab.5: Übersicht über verschiedene Kombinationstherapien mit Fludarabin [Rummel et al., 2002; Keating et al., 2005; Rondell et al., 1997; Tobak et al., 2000]

Kombinationstherapien mit Fludarabin	
Fludarabin/Glukokortikoide	Fludarabin/Cyclophosphamid/Mitoxantron
Fludarabin/Epirubicin	Fludarabin/Cyclophosphamid
Fludarabin/Alemtuzumab	Fludarabin/Rituximab

Hervorzuheben aufgrund hoher Ansprechraten sind ferner Kombinationstherapien mit monoklonalen Antikörpern wie Alemtuzumab und Rituximab [Byrd et al., 2003]. Aufgrund schwerer opportunistischer Infektionserkrankungen seitens Alemtuzumab wird dieser Anti-CD52 Antikörper nur im Rahmen einer second line Therapie angewandt. Rituximab wird aufgrund des deutlich besseren Nebenwirkungsprofils in Kombination mit Fludarabin und / oder Chlorambucil als Standard in der first line Therapie verwendet [Hallek, 2013 b]. Rituximab selbst ist ein anti-CD20-Antikörper, der an das Zielantigen CD20 der B-Lymphozyten bindet. Als Nebenwirkung von Rituximab kann ein allergischer Symptomkomplex mit Fieber, Schüttelfrost, Hauterscheinungen, Übelkeit, Engegefühl im Hals, Dyspnoe und Blutdruckabfall auftreten. Durch die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung kommt es im weiteren Verlauf zur Apoptose der B-Lymphozyten. In einer Studie aus dem Jahr 2003 sprachen 51% der CLL-Patienten innerhalb der ersten 6 Wochen auf die Monotherapie mit Rituximab an. Bei keinem der Patienten kam es zur Krankheitsprogression während der Therapie. 54% der Patienten waren auch nach 20 Monaten progressionsfrei [Hainsworth et al., 2003]. In einer im Jahr 2008 am MD

Anderson Cancer Center angelegten Studie mit 300 CLL-Patienten wurde im Rahmen einer Kombinationstherapie mit Rituximab / Fludarabin / Cyclophosphamid (FCR) eine Gesamtansprechrate von 95% erreicht. Dabei kam es bei 72% der Patienten zu einer kompletten Remission, in 10% zu einer nodulären partiellen Remission sowie in 13% zu einer partiellen Remission. Die mediane Krankheitsprogression lag bei 80 Monaten bei einer 6-Jahres Überlebensrate von 77% [Keating et al., 2005].

Alemtuzumab ist ein an das CD52-Antigen bindender humanisierter Antikörper. Dieses CD52-Antigen wird auf $\geq 95\%$ aller Lymphozyten, ferner auch auf Monozyten und (allerdings in niedrigerer Dichte) auf Granulozyten-Subpopulationen exprimiert. Durch eine körpereigene komplementabhängige und/oder Antikörper-vermittelte Zytotoxizität kommt es zur Lyse der Zielzelle. Allerdings traten unter Alemtuzumab häufiger Lymphozytopeniebedingte, meist viral induzierte, opportunistische Erkrankungen auf [Lozanski et al., 2004]. Alemtuzumab führte bei 33% der bereits durch Fludarabin vorbehandelten und sich in fortgeschrittener Krankheitsphase (RAI III/IV) befindenden Patienten zu einer partiellen Remission mit einer mittleren Überlebenszeit von 32 Monaten [Keating et al., 2002].

Um das Ansprechen auf die Therapie festzustellen, können unterschiedliche Untersuchungen (Blutbild, evtl. Analyse des Knochenmarks) sowie bildgebende Verfahren (Sonographie, CT, in Einzelfällen MRT) durchgeführt werden [Cheson et al., 1996]. Patienten mit kompletter Remission werden in zwei Untergruppen unterteilt, MRD-positive sowie MRD-negative Patienten (minimale Resterkrankung). Bei MRD-positiven Patienten können trotz kompletter Remission im peripheren Blut oder im Knochenmark CLL-Zellen in sehr niedriger Konzentration nachgewiesen werden. Dieser Nachweis korreliert mit einer signifikant kürzeren Zeit sowie einer erniedrigten Überlebenswahrscheinlichkeit. Zum Nachweis einer MRD werden CLL-Zellen entweder durch allelspezifische Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Immunphänotypisierung nachgewiesen [Rawstron et al., 2001; Pfitzner et al., 2003; Böttcher et al., 2004].

1.6 Diagnostik bei der CLL

Aufgrund der klinischen und phänotypischen Heterogenität der CLL ist die Diagnostik sehr breit anzulegen. Zum einen ist eine zytomorphologische Untersuchung des peripheren Bluts durchzuführen; bei speziellen Fragestellungen sollte auch das Knochenmark untersucht werden. Darüber hinaus kommt der Immunphänotypisierung eine besondere Rolle zu: zum einen kann sie die spezifische Lymphomentität anhand der Markerkonstellation klassifizieren, zum anderen eine Abschätzung der Prognose erlauben

(Expression von CD38 und ZAP-70). Aussagekräftige Daten zur Prognose liefern auch FISH, die klassische Zytogenetik und der *IGHV*-Mutationsstatus. Dabei ist die prognostische Bedeutung der zytogenetischen Veränderungen in der FISH-Analyse bereits sehr gründlich evaluiert. Auch besteht Einigkeit hinsichtlich des prognostisch günstigen Einflusses eines mutierten *IGHV*-Status. Jedoch bedürfen die verschiedenen *IGHV*-Rearrangements bzgl. ihres Einflusses auf die Prognose noch der weiteren Aufklärung.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Innerhalb der mutierten *IGHV*-Gene können zahlreiche Subtypen nachgewiesen werden, die ihrerseits eine prognostische Bedeutung haben könnten. Mit dieser Fragestellung wurden in dieser Arbeit 348 CLL-Patienten mit verschiedenen *IGHV*-Mutationssubtypen untersucht. Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die verschiedenen *IGHV*-Mutationssubtypen mit den zytogenetischen Veränderungen nach den Ergebnissen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) korrelieren und ob einer entsprechenden Korrelation ein prognostischer und somit für die Therapie relevanter Einfluss zukommt.

2. Material und Methoden

Es handelt sich bei dieser Arbeit um eine retrospektive statistische Analyse bzw. Auswertung bereits vorliegender Befunde. Die Laboranalysen selbst waren nicht Teil der vorliegenden Arbeit. Sämtliche Daten wurden vom München Leukämie Labor (MLL) zur Durchführung dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1 Patientenproben

In die vorliegende Untersuchung wurden Blut und Knochenmarkproben von 348 erwachsenen Patienten mit der Diagnose einer CLL eingeschlossen. Es wurden 226 Männer und 122 Frauen untersucht (medianes Alter 66,0 Jahre; Bereich 31,2 – 88,8 Jahre). Die Blut- und/oder Knochenmarkproben (19 Knochenmarkproben; 233 Blutproben; 96 Knochenmark- sowie Blutproben) wurden aus verschiedenen hämatologischen Zentren und Praxen im Zeitraum August 2005 bis Januar 2010 zur Diagnostik an das MLL Münchner Leukämielabor eingesandt. Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung entweder eine Erstmanifestation der CLL oder waren therapienaiv bei vordiagnostizierter CLL. Die Diagnose einer CLL wurde auf der Basis der WHO-Kriterien gestellt [Swerdlow et al., 2008]. Alle Patienten wurden vorab aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einwilligung zu den genetischen Analysen sowie zur wissenschaftlichen Auswertung der Laboranalysen.

Die Untersuchung der Blut- und Knochenmarkproben erfolgte anhand von Zytogenetik, der Durchflusszytometrie, Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und Molekulargenetik.

2.2 Zytogenetik

In der Zytogenetik wird die Anzahl und Struktur der Chromosomen lichtmikroskopisch bestimmt. Somit können numerische oder strukturelle Anomalien der Chromosomen nachgewiesen werden. Die klassische Nachweismethode ist die Chromosomen-Bänderungsanalyse.

2.2.1 Technik der Chromosomenanalyse

Zunächst werden die hämatopoetischen Zellen in ein Kulturmedium eingebracht. Nicht proliferierende Lymphozyten werden durch Phytohämagglutinin bei 37°C zur Mitose angeregt. Im Speziellen bei CLL-Patienten hat sich die Anwendung von CC-DSP30 (CPG-Oligonukleotid) bewährt, dieses induziert sowohl die Proliferation normaler sowie leukämischer B-Lymphozyten [Kotkowska et al., 2010]. In Studien von Dicker et al. und Put et al. hat sich mit der Anwendung von CC-DSP 30 in über 95% bzw. 84% der Fälle

eine positive Proliferationsrate gezeigt [Dicker et al., 2006; Put et al., 2008]. Nach einer Kulturdauer von etwa 70 Stunden wird der Mitosehemmer Colchicin (ein Spindelgift) hinzugegeben, welches die Tubulinorganisation zerstört und dadurch die Chromosomen in der Metaphase arretiert. Im Anschluss werden die Zellen abzentrifugiert und in hypotone Salzlösung gegeben. Durch das Eindringen von Wasser durch die semipermeable Zellmembran schwellen Zellen und Chromatin an. Anschließend wird eine Fixierung mit einem Eisessig-Methanol-Gemisch durchgeführt und die Zellen werden auf einen Objektträger aufgetropft. Dabei platzen die Zellen und es kommt zur Ausbreitung der fixierten Chromosomen auf dem Objektträger. Es folgt die Färbung zur Darstellung der typischen Banden, die jedes Chromosom eindeutig charakterisieren. Die häufigsten angewendeten Bänderungstechniken sind die G- (Giemsa), die Q- (Quinarcin) und die R- (reverse) Bandentechnik. Die Struktur und Reihung der Banden ist für jedes Chromosom spezifisch und erlaubt die Identifizierung der einzelnen Chromosomen. Die Chromosomen werden dann bei ca. 1000-facher Vergrößerung durch hoch empfindliche CCD (Charge-coupled device) Kameras fotografiert. Dann werden die einzelnen Chromosomen mit digitaler Unterstützung sortiert und als Karyogramm angeordnet (Abb. 1). Es lassen sich nun zytogenetische Alterationen identifizieren, welche numerischer oder struktureller Genese sein können [Verma R.S. et al. 1995].

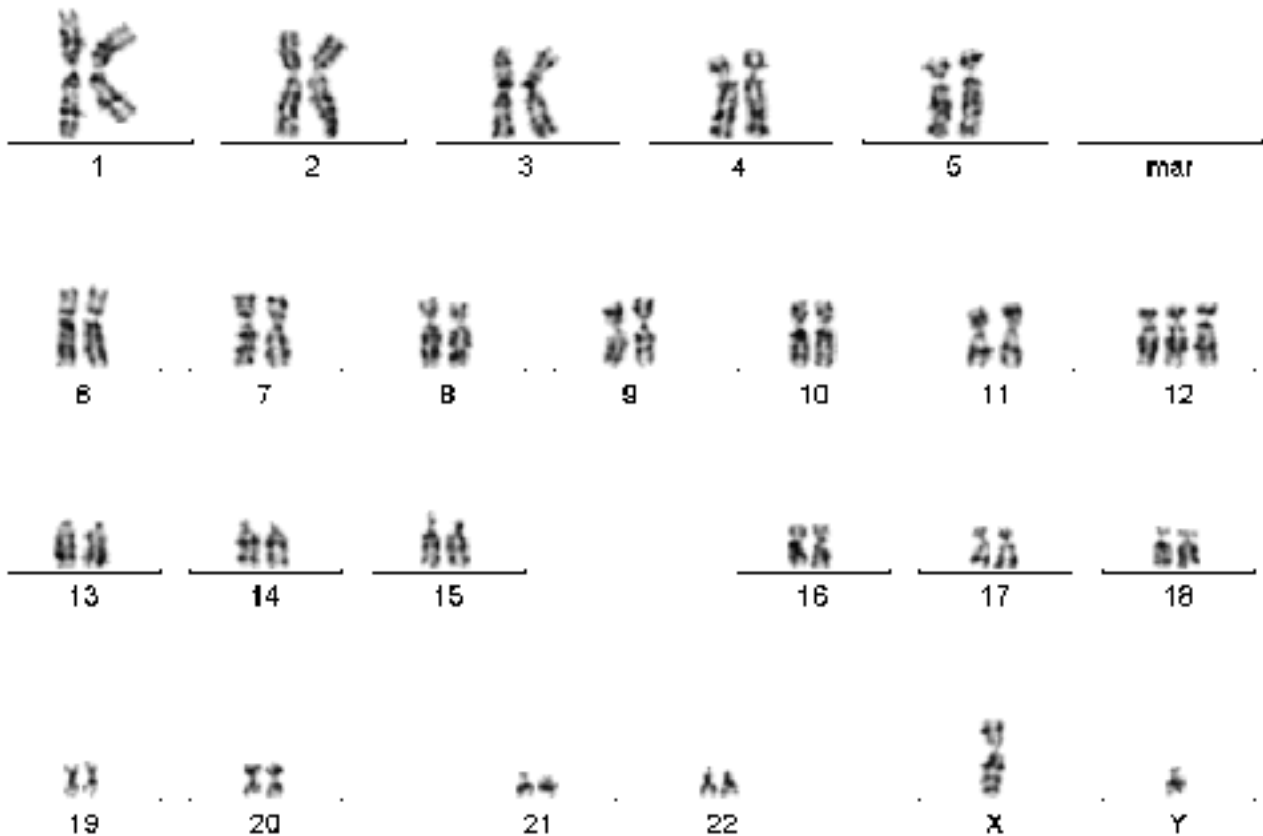


Abb. 1: Nachweis einer Trisomie 12 bei einem Patienten mit einer CLL in der Chromosomenbänderungsanalyse.

2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die „in situ“-Hybridisierung wurde Ende der 1960-er Jahre von den US-amerikanischen Biologen Mary Lou Pardue und Joe Gall entwickelt. Sie verwendeten radioaktiv markierte Sonden, welche mit Hilfe eines Röntgenfilms ausgewertet wurden [Jeffrey et al., 2003]. Sämtliche Hybridisierungsmethoden machen sich das Prinzip der komplementären Basenpaarung zunutze. Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wird mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden nach zytogenetischen Anomalien gesucht. Die Darstellung der fluoreszierenden DNA-Abschnitte kann auf Interphase-Zellkernen oder Metaphase-Chromosomen erfolgen [ISCN 1995 & 2005]. Weitere Methoden der molekularen Zytogenetik sind die 24-Farben-FISH-Analyse und die komparative genomische Hybridisierung (CGH), auf welche hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

2.3.1 Interphase FISH

Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher chromosomaler Veränderungen kann das FISH-Screening an Interphasekernen nur einen Teil der möglichen Anomalien nachweisen und somit die klassische Chromosomenanalyse nicht ersetzen. Ihr Vorteil ist jedoch die höhere Sensitivität - es sind problemlos bis zu 100 oder 200 Interphase-Kerne auswertbar, wodurch sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Sonde eine Sensitivität zwischen 1% und 5% ergibt. Weitere Vorzüge sind die Durchführbarkeit an avitalen Zellen sowie die Aufklärung von zytogenetischen Veränderungen, welche sich mit der alleinigen Chromosomenanalyse nicht vollständig erschließen [Haferlach et al., 2009 c].

2.3.2 Andere FISH-Techniken in der Hämatologie

Bei der Metaphase-FISH-Technik verwendet man sogenannte „Chromosome Painting“-Sonden, welche in der Metaphase die gesamte chromosomale DNA markieren. Diese Technik ermöglicht es, die Ergebnisse einer konventionellen Chromosomenanalyse in schwierigen Fällen zu bestätigen [Haferlach et al., 2009 c]. Die 24-Farben-FISH-Methodik ermöglicht die Identifikation aller Chromosomenpaare in einer einzelnen Hybridisierung. Mit dieser Technik werden komplizierte strukturelle Anomalien dargestellt.

2.3.3 Funktionsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung beruht auf der Paarung von komplementären Basen, welche auf zwei Nukleinsäure-Einzelsträngen lokalisiert sind. Einer der beiden Stränge entstammt dabei einer zuvor hergestellten und markierten Sonde, der andere liegt im Probenmaterial des Patienten vor und soll nachgewiesen werden. Die ersten Arbeitsschritte sind somit die Vorbereitung des Präparats sowie die Vorbereitung der Sonde. Die Sonde besteht meist aus DNA und wird mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z.B. Fluorescein). Da DNA im Probenmaterial als Doppelstrang vorliegt, müssen beide Stränge erst voneinander getrennt bzw. denaturiert werden. Eine Denaturierung erreicht man entweder durch Änderung des pH-Werts oder durch Hitze. Im Fall der Hitzedenaturierung wird der Schmelzpunkt meist durch Zugabe von Formamid abgesenkt, welches durch seine starke Polarität die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Einzelsträngen abschwächt. Somit wird die Struktur der Chromosomen weniger stark zerstört als durch die reine Anwendung von Hitze. Anschließend kommt es zur Hybridisierung der Nukleinsäuren des Präparats mit den komplementären Nukleinsäuren der FISH-Sonde. Nicht oder unspezifisch gebundene Sondenmoleküle werden herausgewaschen. Die an das Probenmaterial hybridisierte Sonde kann jedoch über den an sie gebundenen

Fluoreszenz-Farbstoff nachgewiesen werden. In einer Analyse können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, so dass verschiedene Chromosomenabschnitte oder Genloci gleichzeitig mit unterschiedlichen Sonden untersucht werden können [Jeffrey et al., 2003].

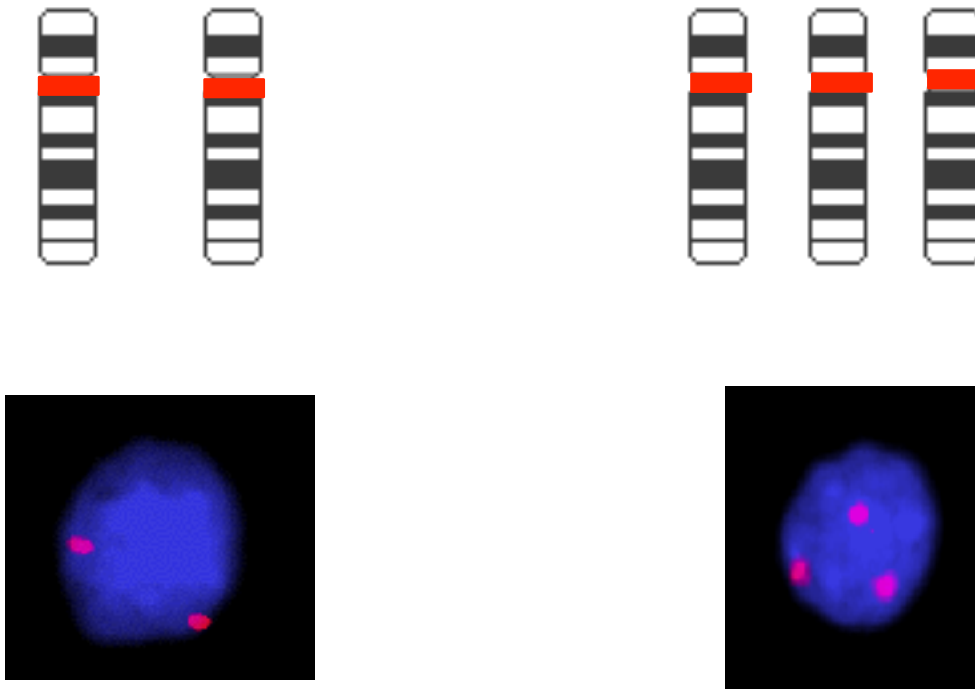


Abb. 2: Nachweis einer Trisomie 12 bei einem Patienten mit CLL mittels der FISH-Analyse.

2.3.4 Die hier im Speziellen angewandte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FISH wurde bei allen Fällen an Interphasekernen aus einem Knochenmarksausstrich oder peripherem Blut durchgeführt. Das FISH-Panel beinhaltete Sonden zum Nachweis einer Trisomie 12 („CEP#12“), Deletionen der Chromosomenabschnitte 11q22.3 („ATM“), 13q14 („13q“), 17p13 („TP53“) (Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Darüber hinaus wurde bei allen Patienten Interphase-FISH mit Sonden für die Translokation t(11;14)/IGH-CCND1 durchgeführt, um ein Mantelzelllymphom auszuschließen.

2.4 IGHV-Mutationsstatus

Diese molekulargenetische Methode dient dem Nachweis des Anteils somatischer Hypermutationen in der variablen Region der Immunglobulin-Schwerkettengene. Während der B-Zell-Entwicklung werden die VH, DH, und JH-Regionen der Immunglobulin-

Schwerkettengene auf Ebene der genomischen DNA zu einem einzelnen VDJ-Rearrangement zusammengefügt. An der Blut- oder Knochenmarkprobe wird eine sogenannte Ficoll-Gradienten-Trennung durchgeführt und die dabei gewonnene mononukleäre Zellfraktion für die weiteren Analysen genützt. Aus der Zellfraktion kann genomische DNA oder RNA (für die Synthese von cDNA bzw. komplementärer DNA) isoliert werden.

2.4.1 Technik der *IGHV*-Analyse

In dieser Arbeit wurde für die *IGHV*-Analyse [Dicker et al., 2006] stets auf cDNA-Ebene gearbeitet, um nur funktionell relevante Rearrangements zu erfassen. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark isoliert, in 300 µL RLT Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) asserviert und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Die mRNA wurde mit MagnaPure LC mRNA Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) extrahiert. Die Synthese der cDNA aus mRNA wurde mittels 300 U Superscript II (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und random Hexamer Primern durchgeführt (Pharmacia, Freiburg, Deutschland).

Anschließend wurden die Klon-spezifischen *IGHV*-Gene amplifiziert. Die verschiedenen PCR-Assays verwendeten entweder Consensus-Primer, alternativ ein Panel verschiedener *IGHV* Gen-spezifischer Primer, welche in einer Multiplex-Reaktion zusammengefasst sind. Hier wurden 6 unterschiedliche zusammenhängende framework region (FR1) VH forward Primer (VH1-6) und 1 zusammenhängender joining region JH reverse Primer verwendet. Die durch die Klonierung neu entstandenen und angeordneten Immunglobuline wurden durch 2 Multiplex PCRs nachgewiesen. Zur Auftrennung und Auswertung der PCR-Produkte wurde eine Fragmentanalyse anhand der Genescan-Methodik durchgeführt. Es wurde ein 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Ließ sich ein monoklonales Rearrangement in der Klonalitäts-Analyse nachweisen, erfolgte eine weitere Amplifikation anhand der PCR und eine direkte Sanger-Sequenzierung der im Genescan ermittelten klonalen Fragmente. Die Sequenzen wurden mit einer online verfügbaren Datenbank (<http://www.imgt.org/textes/IMGTScientificChart>) abgeglichen. Dadurch ergaben sich das individuelle klonale Rearrangement des *IGHV*-Gens und die Anzahl der eventuell darin vorliegenden Hypermutationen. Der *IGHV* Status wird als mutiert betrachtet, wenn mehr als 2% somatische Hypermutationen im Vergleich zur am besten passenden Gensequenz nachgewiesen werden können.

2.5 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung analysiert mittels der multiparametrischen Durchflusszytometrie die Expression verschiedener Antigene auf den Oberflächen oder (nach Permeabilisierung der Zellmembran) im Zytoplasma von Zellen. Es werden monoklonale Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Diese binden an die jeweiligen Oberflächen- oder intrazellulären Antigene. Aus der Expression der verschiedenen Antigene lassen sich Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellreihe, den Differenzierungsgrad der Zellen, oder einen bestimmten Zelltyp ziehen. Die Antigene werden nach der CD-Nomenklatur bezeichnet [Lothar, 2008].

2.6 Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Durchflusszytometer sind apparative Plattformen, die mit sehr hoher Flexibilität die quantitative Vermessung und Charakterisierung intakter Zellen erlauben. Der hydrodynamische Transport von Zellen und deren optische Vermessung nach spezifischen Färbungen stellen hierbei die Grundlagen dar. Die Grundprinzipien sind wie folgt: Eine Suspension von Zellen wird in einem Hüllstrom verdünnt und anschließend in einer Sequenz von Einzelzellen rechtwinklig an einer bestimmten Lichtquelle vorbeigeführt. Am Meßpunkt, dem gemeinsamen Fokus des Probenstroms und eines Lasers als monochromatischer Lichtquelle, werden die physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen analysiert. Informationen hierfür liefert die Streuung des Anregungslichts und die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen. Anhand des Grades der Ablenkung des Laserlichts kann die Größe und die Granularität der Zelle beschrieben werden. Das forward scatter („FSC“) kann als Größenmaß von Zellen betrachtet werden, das sideward scatter („SSC“) ist zum großen Teil abhängig von der Lichtstreuung intrazellulärer Bestandteile. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale ist von der Menge gebundener Antikörper, dem nukleären DNA-Gehalt, oder den biochemischen Eigenschaften der Zelle abhängig. Die spektral unterschiedlichen Lichtsignale werden dann über einen Photomultiplier aufgenommen und in elektronische Signale umgewandelt. Um spezifische Zellen herauszufiltern, wird während der Datenaufnahme ein Triggerparameter/Schwellenwert definiert. Als Triggerparameter können die Zellen sowohl über die Größe als auch über einen DNA-Farbstoff oder Antikörper identifiziert werden [Rothe, 2007].

Es gilt zu bedenken, dass die Fluoreszenz-Farbstoff-markierten Antikörper nicht nur spezifisch mittels Epitop an das jeweilige Antigen auf oder in der Zelle binden, gegen

welches sie spezifisch gerichtet sind, sondern dass sie auch nicht-spezifisch an die Zellen mittels FC-Rezeptor binden können.

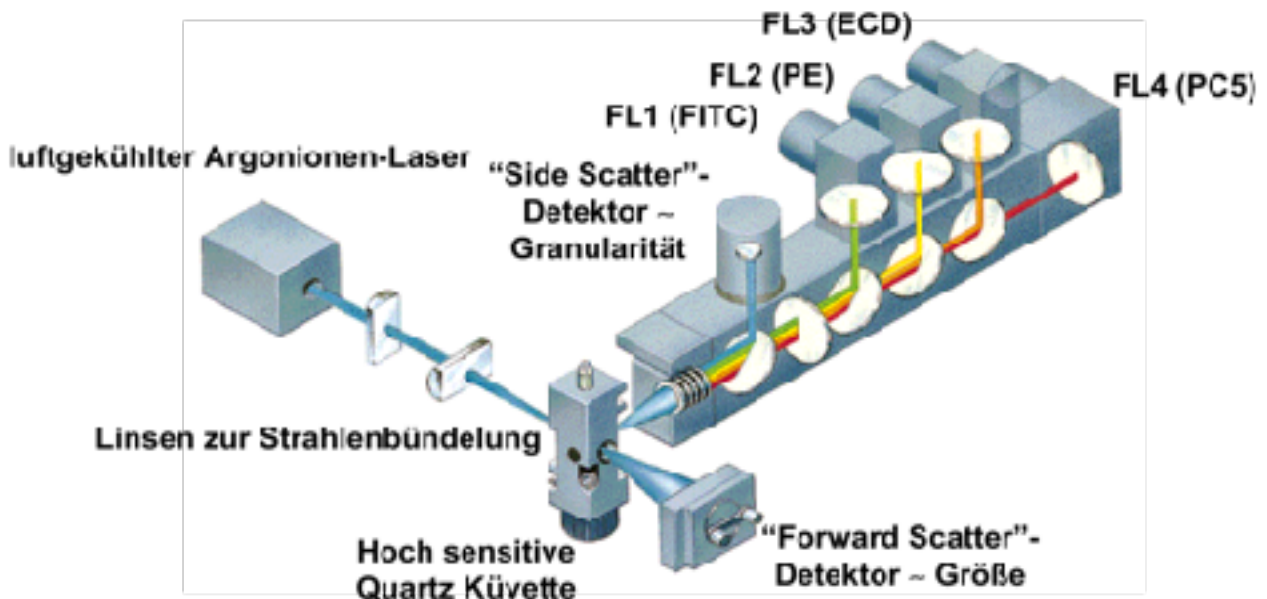
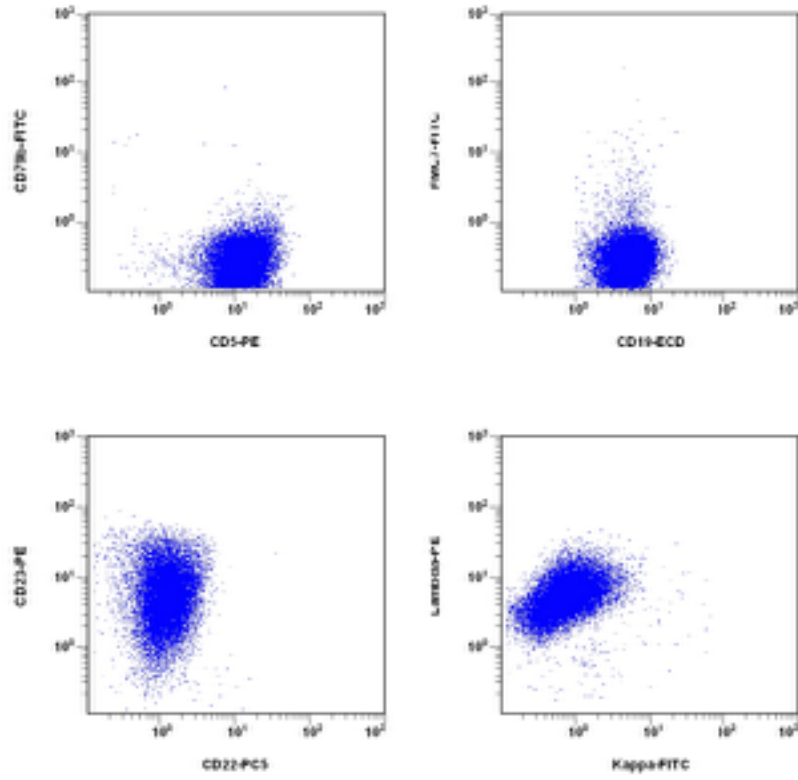


Abb. 3: Schema eines Durchflusszytometers für die multiparametrische Durchflusszytometrie (Epics XL-MCL, Beckman Coulter).

2.6.1 Durchflusszytometrische Analysen in dieser Arbeit

Hundert Mikroliter Blut oder Knochenmark wurden zuerst mit 10 μ l Antikörpergemisch bei 20°C Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden dann mit Lysepuffer aufgefüllt, erneut inkubiert, und anschließend zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands erfolgte eine Resuspension des Pellets mit PBS-Lösung. Damit war die Vorbereitung der Proben vor der Messung am Durchflusszytometer abgeschlossen. Für die Darstellung der Oberflächenleichtketten (κ/λ) sowie zytoplasmatischer Antigene erfolgten Modifikationen an diesem Protokoll, auf welche hier aber nicht genauer eingegangen werden soll. Nach einer Fünffach-Färbung erfolgte die durchflusszytometrische Analyse auf einem FC500-Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Miami, Florida). Für die Berechnung und Analyse wurde CXP Software (Beckman Coulter, Miami, Florida) verwendet. Es wurde jeweils eine Isotopen-Kontrolle durchgeführt. Das verwendete Antikörper-Panel ist in Tabelle 1 dargestellt. Für den Befund einer CLL ist beispielsweise die Koexpression der Antigene CD5 und CD19 charakteristisch (Abb. 4). Das Antigen CD23 ist ebenfalls deutlich positiv, wodurch die Abgrenzung der CLL vom (ebenfalls CD5-positiven) Mantelzelllymphom erleichtert wird.

CLL



Mantelzellymphom

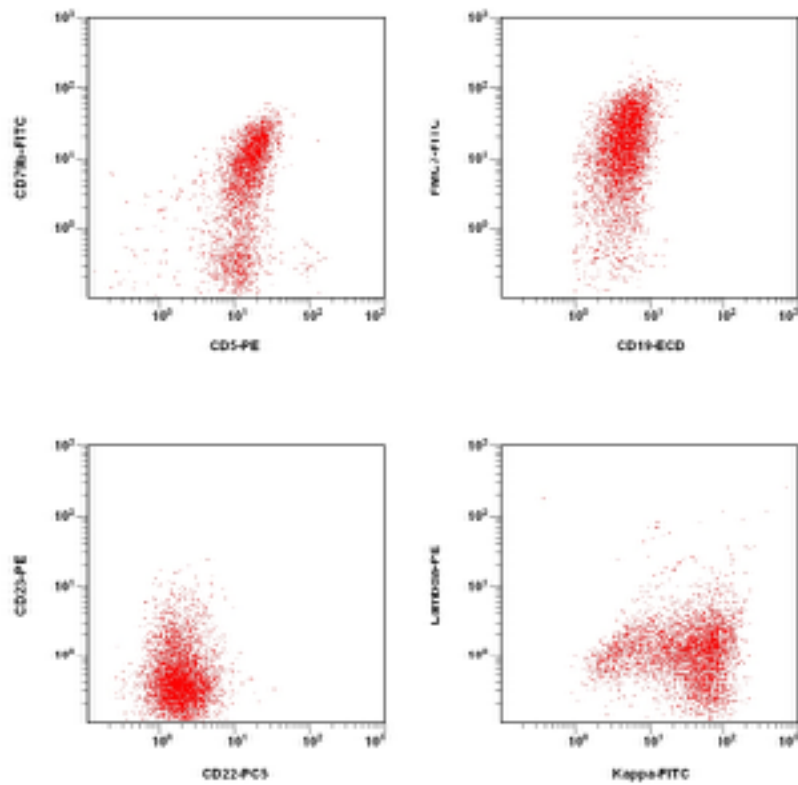


Abb. 4: Charakteristische durchflusszytometrische Befunde bei CLL und Mantelzelllymphom. Abbildung oben: Ein Fall von CLL mit Negativität für CD79b und FMC7, Positivität für CD23 und schwacher Fluoreszenzintensität der restringierten Leichtketten. Abbildung unten: Ein Fall von Mantelzelllymphom mit Expression von CD79b und FMC7, Negativität von CD23 und stärkerer Fluoreszenzintensität der Leichtketten.

2.7 Statistik

In die statistische Auswertung wurden *IGHV*-Subtyp-Gruppen ab einer Größe von mindestens fünf Fällen einbezogen. *IGHV*-Subtypen, welche bei weniger Patienten vorkamen, wurden nur deskriptiv dargestellt.

Korrelationen kategorialer Variablen wurden nach der „chi square“ Methode berechnet. Unterschiede bzgl. kontinuierlicher Parameter wurden nach dem „Student’s T-test“ analysiert. Für die Analyse der Prognose wurden das Kriterium „Time to treatment“ (TTT) untersucht, das der Zeitspanne zwischen der Diagnosestellung und dem Beginn der ersten Chemotherapie entspricht. Die TTT wurde nach der Kaplan Meier Methode berechnet. Für die statistische Analyse wurde die Software SPSS Version 19.0.0 (SPSS by IBM, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) verwendet.

2.8 Grundlagen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der *IGHV*-Analysen mit den Ergebnissen der FISH-Analytik und der Prognose korreliert. Es handelte sich um eine retrospektive statistische Analyse bzw. Auswertung bereits vorliegender Befunde. Die Laboranalysen selbst waren nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 348 CLL Patienten, bei welchen ein mutierter *IGHV*-Status vorlag, untersucht. Zunächst wurde die Häufigkeit der verschiedenen beobachteten *IGHV*-Subtypen untersucht, anschließend die Frequenz bestimmter zytogenetischer Veränderungen anhand der FISH-Analytik. Im nächsten Schritt wurden innerhalb der *IGHV*-Subtypen die Häufigkeiten der zytogenetischen Veränderungen analysiert. Die mediane Nachbeobachtungszeit lag bei 19,3 Monaten, die mediane time to treatment (TTT) lag bei 70,3 Monaten.

3.1 *IGHV*-Subtypen

Bei 348 Patienten konnten insgesamt 95 verschiedene *IGHV*-Subtypen nachgewiesen werden, 15/348 der Patienten konnten keiner Subgruppe zugeordnet werden. Die verbleibenden 333 Patienten sind in Tabelle 6.0 aufgeführt. Am häufigsten waren die *IGHV*-Subtypen VH1-69, VH4-34 und VH3-23 mit 42 (12,6% der untersuchten Patienten), 34 (8,0% der untersuchten Patienten) und 29 (7,2% der untersuchten Patienten) betroffenen Patienten. Es war somit eine „Clusterbildung“ für verschiedene *IGHV*-Subtypen zu verzeichnen, in der sich 85,0 % aller Patienten verteilt auf 19 *IGHV*-Subtypen wiederfanden, während 15,0 % der Patienten weniger häufigen *IGHV*-Subtypen zugeordnet waren.

Tab. 6.0: Anzahl der Patienten mit bestimmten *IGHV*-Subtypen sowie Frequenz in der Gesamtkohorte

<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)	<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)
VH1-18	7 (2,1%)	VH3-64	1 (0,3%)
VH1-2	14 (4,2%)	VH3-66	2 (0,6%)
VH1-3	7 (2,1%)	VH3-7	21 (6,3%)
VH1-46	6 (1,8%)	VH3-70	1 (0,3%)
VH1-58	4 (1,2%)	VH3-72	5 (1,5%)
VH1-69	42 (12,6%)	VH3-74	11 (3,3%)
VH1-8	2 (0,6%)	VH3-9	3 (0,9%)

<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)	<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)
VH2-26	2 (0,6%)	VH3-30	1 (0,3%)
VH2-5	8 (2,4%)	VH3-31	1 (0,3%)
VH3-7	1 (0,3%)	VH4-34	32 (9,6%)
VH3-11	7 (2,1%)	VH4-39	14 (4,2%)
VH3-13	2 (0,6%)	VH4-4	11 (3,3%)
VH3-15	3 (0,9%)	VH4-59	6 (1,8%)
VH3-21	24 (7,2%)	VH4-61	4 (1,2%)
VH3-23	29 (8,7%)	VH4-b	2 (0,6%)
VH3-30	17 (5,1%)	VH5-51	2 (0,6%)
VH3-33	12 (3,6%)	VH5-a	4 (1,2%)
VH3-43	2 (0,6%)	VH6-1	4 (1,2%)
VH3-48	10 (3,0%)	VH7-4	1 (0,3%)
VH3-49	4 (1,2%)	Gesamtzahl (Prozent von 333 Patienten)	333 (100%)
VH3-53	4 (1,2%)		

3.1.1 Häufige *IGHV*-Subtypen

Die statistischen Analysen bzgl. Korrelation mit zytogenetischen Veränderungen und der TTT wurden auf die 19 *IGHV*-Subtypen beschränkten, die bei mindestens fünf Patienten nachwiesen wurden. Tabelle 6.1 zeigt diese *IGHV*-Subtypen, die bei insgesamt 283/333 Patienten identifiziert wurden.

Tab. 6.1: Darstellung aller 19 *IGHV*-Subtypen, welche bei mindestens fünf Patienten nachgewiesen wurden. Die Tabelle gibt die Anzahl der betroffenen Patienten sowie die Frequenz in der Gesamtkohorte an.

<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)	<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> -Subtyp (%)
VH1-18	7 (2,1%)	VH3-48	10 (3,0%)
VH1-2	14 (4,2%)	VH3-7	21 (6,3%)
VH1-3	7 (2,1%)	VH3-72	5 (1,5%)
VH1-46	6 (1,8%)	VH3-74	11 (3,3%)
VH1-69	42 (12,6%)	VH4-34	32 (9,6%)
VH2-5	8 (2,4%)	VH4-39	14 (4,2%)
VH3-11	7 (2,1%)	VH4-4	11 (3,3%)
VH3-21	24 (7,2%)	VH4-59	6 (1,8%)
VH3-23	29 (8,7%)	Anzahl (% der Gesamtkohorte)	283/333 (85,0%)
VH3-30	17 (5,1%)		
VH3-33	12 (3,6%)		

3.1.2 Altersverteilung in der Gesamtkohorte

Bei der Untersuchung der Altersverteilung ergab sich in der Gesamtkohorte ein Mittelwert von 65,3 Jahren. Für keine der *IGHV*-Subgruppen bestand ein signifikanter Unterschied im mittleren Alter im Vergleich zur Gesamtkohorte. Für alle *IGHV*-Subgruppen lag die Maximalabweichung vom Kohortenmittelwert bei unter 10 Jahren, bei *IGHV*-Subtypgruppen mit einer Patientenanzahl ≥ 5 lag sie bei unter 5 Jahren.

Tab. 6.2: Zuordnung des Altersmittelwertes zu den einzelnen *IGHV*-Subtypen sowie im Vergleich zur Gesamtkohorte.

<i>IGHV</i>-Subtyp (Patientenanzahl)	Mittelwert Alter in Jahren	<i>IGHV</i>-Subtyp (Patientenanzahl)	Mittelwert Alter in Jahren
VH1-18 (7)	64,4	VH3-64 (1)	78,0
VH1-2 (14)	64,0	VH3-66 (2)	57,0
VH1-3 (7)	60,1	VH3-7 (21)	63,2
VH1-46 (6)	65,3	VH3-70 (1)	63,0
VH1-58 (4)	71,2	VH3-72 (5)	71,0
VH1-69 (42)	60,7	VH3-74 (11)	62,2
VH1-8 (2)	69,0	VH3-9 (3)	67,7
VH2-26 (2)	68,0	VH3-30 (1)	55,0
VH2-5 (8)	60,2	VH3-31 (1)	74,0
VH3-7 (1)	73,0	VH4-34 (32)	63,4
VH3-11 (7)	57,0	VH4-39 (14)	65,6
VH3-13 (2)	58,0	VH4-4 (11)	67,4
VH3-15 (3)	64,6	VH4-59 (6)	63,5
VH3-21 (24)	65,4	VH4-61 (4)	59,0
VH3-23 (29)	66,8	VH4-b (2)	76,0
VH3-30 (17)	65,9	VH5-51 (2)	65,5
VH3-33 (12)	67,3	VH5-a (4)	75,2
VH3-43 (2)	65,0	VH6-1 (4)	57,0
VH3-48 (10)	62,8	VH7-4 (1)	76,0

IGHV-Subtyp (Patientenanzahl)	Mittelwert Alter in Jahren	IGHV-Subtyp (Patientenanzahl)	Mittelwert Alter in Jahren
VH3-49 (4)	70,2	IGHV-Subtyp (Patientenanzahl)	65,38 Jahre (Mittelwert Gesamtkohorte)
VH3-53 (4)	67,0		

3.1.3 Geschlechtsverteilung bei einzelnen *IGHV*-Subtypen

Die Patienten waren in der Gesamtkohorte zu 212 (63,7%) männlichen Geschlechts und zu 121 (36,3%) weiblichen Geschlechts. Es ergab sich somit eine Ratio Männer/Frauen von 1,9.

Es wurde untersucht, ob sich hinsichtlich der einzelnen *IGHV*-Subtypen Abweichungen von dieser Verteilung der Geschlechter ergaben. Tabelle 6.2 zeigt die Geschlechtsverteilung innerhalb der häufigeren *IGHV*-Subtypen (mit jeweils mindestens 5 Patienten). Für keinen der *IGHV*-Subtypen wurde eine signifikante Abweichung der Geschlechterratio im Vergleich zur Gesamtkohorte beobachtet.

Tab. 6.3: Geschlechtsverteilung innerhalb der häufigen *IGHV*-Subtypen

IGHV-Subtyp	Anzahl der Patienten/ IGHVSubtyp (%)	Anzahl der männlichen Patienten	Anzahl der weiblichen Patienten	Ratio Männer/ Frauen
VH1-18	7 (12,1%)	6	1	6,0
VH1-2	14 (4,2%)	9	5	1,8
VH1-3	7 (2,1%)	6	1	6,0
VH1-46	6 (2,9%)	4	2	3,0
VH1-58	4 (1,2%)	1	3	0,3
VH1-69	42 (12,6%)	28	13	2,0
VH 1-8	2 (0,6%)	0	2	0,0
VH2-26	2 (0,6%)	1	1	1,0

IGHV-Subtyp	Anzahl der Patienten/ IGHVSubtyp (%)	Anzahl der männlichen Patienten	Anzahl der weiblichen Patienten	Ratio Männer/ Frauen
VH2-5	8 (2,4%)	6	2	3,0
VH3-11	7 (2,1%)	5	2	2,5
VH 3-13	2 (0,5%)	1	1	1,0
VH3-15	3 (0,9%)	1	2	0,5
VH3-21	24 (7,2%)	17	7	2,4
VH3-23	29 (8,7%)	18	11	1,6
VH3-30	13 (3,9%)	8	5	1,6
VH3-30-3	4 (1,2%)	4	0	4,0
VH3-33	12 (3,6%)	9	3	3,0
VH3-43	2 (0,6%)	1	1	1,0
VH3-48	10 (3,0%)	7	3	2,3
VH3-49	4 (1,2%)	2	2	1,0
VH3-53	4 (1,2%)	2	2	1,0
VH3-64	1 (0,3%)	0	1	0,0
VH3-66	2 (0,6%)	1	1	1,0
VH3-7	21 (6,3%)	12	9	1,2
VH3-70	1 (0,3%)	1	0	1,0
VH3-72	5 (1,5%)	3	2	1,5
VH3-74	11 (3,3%)	6	5	1,5
VH3-9	3 (0,9%)	2	1	2,0
VH4-30-4	1 (0,3%)	0	1	0,0

<i>IGHV</i> -Subtyp	Anzahl der Patienten/ <i>IGHV</i> Subtyp (%)	Anzahl der männlichen Patienten	Anzahl der weiblichen Patienten	Ratio Männer/ Frauen
VH4-31	1 (0,3%)	1	0	1,0
VH4-34	33 (9,9%)	22	11	3,0
VH4-39	13 (3,9%)	8	5	1,6
VH4-4	11 (3,3%)	5	6	0,8
VH4-59	6 (2,9%) ⁵	5	1	5,0
VH4-61	4 (1,2%)	3	1	3,0
VH4-b	2 (0,6%)	2	0	2,0
VH5-51	2 (0,6%)	1	1	1,0
VH5-a	4 (1,2%)	1	3	0,3
VH6-1	4 (1,2%)	2	2	1,0
VH7-4-1	1 (0,3%)	0	1	0,0

3.1.4 Zytogenetische Veränderungen in der Gesamtkohorte

Zunächst wurden alle 333 Patienten mit zugeordneter *IGHV*-Subgruppe in Bezug auf die zytogenetischen Veränderungen anhand der Interphase-FISH-Diagnostik charakterisiert. Am häufigsten war eine Deletion 13q14, welche bei 210 (63,2%) der 333 Patienten nachgewiesen wurde. Bei 162 (48,6%) Patienten wurde sie als einzige Veränderung („13q sole“) festgestellt. 38 (11,4%) der 333 Patienten wiesen eine 11q22.3 Deletion auf. Bei 40 (12,0%) Patienten wurde eine Trisomie 12 nachgewiesen. Bei 21 (6,3%) Patienten wurde eine Deletion 17p13 nachgewiesen. Eine Translokation t(11;14)(q13;q32) wurde bei 2 (0,9%) Patienten festgestellt (siehe Tab. 6.4).

Tab. 6.4: Zytogenetische Veränderungen in der Gesamtkohorte

Zytogenetische Veränderungen	Anzahl der Patienten/ Gesamtkohorte (%)
Deletion 13q14	210/333 (63,2%)
Deletion 13q14 „sole“	162/333 (48,6%)
Trisomie 12	40/333 (12,0%)
Deletion 11q22.3	38/333 (11,4%)
Deletion 17p13	21/333 (6,3%)
t(11;14)(q13;q32)	2/333 (0,9%)

3.2 Verteilung der *IGHV*-Subtypen in den verschiedenen zytogenetischen Subgruppen

3.2.1 *IGHV*-Subtypen bei Patienten mit 13q-Deletion

Bei 210 (63,0%) der 333 Patienten wurde eine Deletion 13q14 nachgewiesen. Im Vergleich zu Patienten ohne 13q-Deletion wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es zeigte sich eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH 4-39 (5/210 (2,4%) vs. 8/123 (6,5%) Patienten, $P=0,079$).

3.2.2 *IGHV* Subtypen bei Patienten mit 13q-Deletion als einzige Aberration

Bei 162 (48,6%) der 333 Patienten wurde als einzige Aberration eine Deletion 13q („13q sole“) nachgewiesen. Im Vergleich zu Patienten ohne 13q-Deletion als alleinige Aberration wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Frequenz für den *IGHV*-Subtyp VH4-4 (9/162 (5,6%) vs. 2/171 (1,2%) Patienten, $P=0,031$).

3.2.3 *IGHV* Subtypen bei Patienten mit Trisomie 12

Bei 40 der 333 Patienten (12,0%) war eine Trisomie 12 nachweisbar. Im Vergleich zu Patienten ohne Trisomie 12 wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es ergab sich eine Tendenz für eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH4-31 (1/40 (2,5%) vs. 1/293 (0,0%) Patienten, $P=0,120$) sowie für eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH3-7 (8/40 (20%) vs. 13/293 (4,4%) Patienten,

$P=0,001$). Des Weiteren zeigte sich eine höhere Frequenz für den *IGHV*-Subtyp VH5-a (2/40 (5,0%) vs. 2/293 (0,7%) Patienten, $P=0,072$).

3.2.4 *IGHV*-Subtypen bei Patienten mit 11q-Deletion

38 (11,4%) der 333 Patienten wiesen eine 11q-Deletion (*ATM*) auf. Im Vergleich zu Patienten ohne 11q-Deletion wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es ergab sich eine Tendenz für eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH1-46 (2/38 (5,26%) vs. 4/295 (1,36%) Patienten, $P=0,142$) sowie für eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH4-34 (1/38 (2,6%) vs. 33/295 (11,2%) Patienten, $P=0,150$). Des Weiteren zeigte sich eine signifikant niedrigere Frequenz für den *IGHV*-Subtyp VH3-43 (2/38 (5,3%) vs. 0/295 (0,0%) Patienten, $P=0,013$).

3.2.5 *IGHV* Subtypen bei Patienten mit 17p-Deletion

Bei 21 (6,3%) der 333 Patienten ließ sich eine Deletion von 17p13 (*TP53*) nachweisen. Im Vergleich zu Patienten ohne 17q-Deletion wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es zeigte sich eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH1-18 (2/21 (0,95%) vs. 5/312 (1,6%) Patienten, $P=0,066$) sowie für eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH 3-70 (1/21 (4,8%) vs. 0/312 (0,0%) Patienten, $P=0,063$). Des Weiteren zeigte sich eine niedrigere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH4-31 (1/21(4,8%) vs. 0/312 (0,0%) Patienten, $P=0,063$).

3.2.6 *IGHV*-Subtypen bei Patienten mit *IGH-CCND1*-Rearrangement

Bei 2 (0,6%) der 333 Patienten wurde eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)/IGH-CCND1$ nachgewiesen. Im Vergleich zu Patienten ohne Translokation $t(11;14)$ wurden Unterschiede in der Frequenz bestimmter *IGHV*-Subtypen beobachtet: Es zeigte sich eine höhere Frequenz des *IGHV*-Subtyps VH1-2 (1/2 (50,0%) vs. 13/331 (3,9%) Patienten, $P=0,082$). Des Weiteren zeigte sich eine signifikant höhere Frequenz für den *IGHV*-Subtyp VH 4-59 (1/2 (50,0%) vs. 5/331 (1,5%) Patienten). Eine statistische Testung auf Signifikanz wurde aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe mit $t(11;14)(q13;q32)$ nicht vorgenommen.

3.3 Klinische Bedeutung der unterschiedlichen *IGHV*-Subtypen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die verschiedenen *IGHV*-Subtypen einen Einfluss auf das Zeitintervall bis zum Therapiebeginn haben. Auch hier wurden nur die häufigeren *IGHV*-Subtypen (mindestens 5 Patienten vorhanden) in die Analyse einbezogen. Daten

zur TTT lagen für 318 der 333 Patienten vor. Die Angaben zur medianen TTT für die einzelnen *IGHV*-Subgruppen sind der Tabelle 6.5 zu entnehmen.

Tab. 6.5: Mediane „time to treatment“ (TTT) bei verschiedenen *IGHV*-Subtypen.

<i>IGHV</i> Subtyp	Ja (1) / Nein (0)	Anzahl	Mediane TTT (Monate)	Signifikanz
VH1-2	1	10	nicht erreicht	$P=0,150$
	0	308	70,3	
VH1-18	1	6	58,9	$P=0,596$
	0	312	89,9	
VH1-3	1	7	nicht erreicht	$P=0,840$
	0	311	70,3	
VH1-46	1	5	9,5	$P=0,881$
	0	313	70,3	
VH1-69	1	39	54,4	$P=0,795$
	0	279	89,9	
VH2-5	1	8	nicht erreicht	$P=0,506$
	0	310	70,3	
VH3-11	1	7	7,8	$P=0,017$
	0	311	70,3	
VH3-21	1	24	70,3	$P=0,248$
	0	294	89,9	
VH3-23	1	27	nicht erreicht	$P=0,130$
	0	291	58,9	

<i>IGHV</i> Subtyp	Ja (1) / Nein (0)	Anzahl	Mediane TTT (Monate)	Signifikanz
VH3-30	1	13	nicht erreicht	$P=0,512$
	0	305	70,3	
VH3-33	1	12	nicht erreicht	$P=0,822$
	0	306	70,3	
VH3-48	1	10	nicht erreicht	$P=0,733$
	0	308	70,3	
VH3-7	1	21	nicht erreicht	$P=0,328$
	0	297	70,3	
VH3-72	1	5	nicht erreicht	$P=0,691$
	0	313	70,3	
VH3-74	1	11	nicht erreicht	$P=0,817$
	0	307	70,3	
VH4-34	1	33	nicht erreicht	$P=0,178$
	0	285	70,3	
VH4-39	1	13	28,8	$P=0,441$
	0	305	70,3	
VH4-4	1	11	25,9	$P=0,703$
	0	307	70,3	
VH4-59	1	5	nicht erreicht	$P=0,948$
	0	313	70,3	

Bei folgenden *IGHV*-Subtypen zeigten sich Unterschiede bezüglich der TTT, welche allerdings für die meisten Subgruppen aufgrund der kleinen Gruppengrößen keine Signifikanz erreichten:

3.3.1. VH1-2

Bei der *IGHV*-Subgruppe VH1-2 (n=10) wurde die mediane TTT nicht erreicht und war somit länger als bei den restlichen Patienten (n=308) mit 70,3 Monaten ($P=0,150$).

3.3.2. VH1-18

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH1-18 (n=6) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=312) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 58,9 vs. 89,6 Monate; $P=0,596$).

3.3.3. VH1-3

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH1-3 (n=7) wurde die mediane TTT nicht erreicht, weiteres gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=311) in Bezug auf eine kürzere TTT ($P=0,881$).

3.3.4. VH1-46

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH1-46 (n=5) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=313) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 9,5 vs. 70,3 Monate; $P=0,881$).

3.3.5. VH1-69

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH1-69 (n=39) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=279) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 54,4 vs. 89,9 Monate, $P=0,795$).

3.3.6. VH3-1

Bei der *IGHV* Subgruppe VH3-11 (n=7) wurde eine im Vergleich zu den restlichen Patienten (n=311) signifikant kürzere TTT beobachtet (Median 7,8 vs. 70,3 Monate, $P=0,017$).

3.3.7. VH3-21

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH3-21 (n=24) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=294) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 70,3 vs. 89,9 Monate; $P=0,248$).

3.3.8. VH3-23

Bei der *IGHV* Subgruppe VH3-23 (n=27) wurde die mediane TTT nicht erreicht und war somit länger als bei den restlichen Patienten (n=291) mit 70,3 Monaten ($P=0,130$).

3.3.9. VH3-30

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH3-30 (n=13) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=305) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,512$).

3.3.10. VH3-33

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH3-33 (n=12) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=306) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,812$).

3.3.11. VH3-48

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe IGHV3-48 (n=10) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=308) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,328$).

3.3.12. VH3-7

Bei Patienten der *IGHV*-Subgruppe VH3-7 (n=21) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=297) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,328$).

3.3.13. VH3-72

Bei Patienten der *IGHV*-Subgruppe VH3-7 (n=5) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=313) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,691$).

3.3.14. VH3-74

Bei Patienten der *IGHV*-Subgruppe VH3-74 (n=11) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=311) lag diese bei 70,3 Monaten ($P=0,817$).

3.3.15. VH4-34

Bei Patienten der *IGHV*-Subgruppe VH4-34 (n=33) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=285) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,178$).

3.3.16. VH4-39

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH4-39 (n=13) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=305) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 28,8 vs. 70,3 Monate, $P=0,441$).

3.3.17. VH4-4

Bei Patienten mit der *IGHV*-Subgruppe VH4-4 (n=11) gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der restlichen Kohorte (n=307) in Bezug auf eine kürzere TTT (Median 25,9 vs. 70,3 Monaten, $P=0,703$).

3.3.18. VH4-59

Bei der *IGHV*-Subgruppe VH4-59 (n=5) wurde die mediane TTT nicht erreicht. Bei den restlichen Patienten (n=313) lag sie bei 70,3 Monaten ($P=0,703$).

3.4 *IGHV*-Gruppen mit besonders kurze TTT

Für folgende *IGHV* Subtypen ermittelten wir eine besonders kurze mediane TTT:

- VH1-46 mit einer medianen TTT von 9,5 Monaten
- VH3-11 mit einer medianen TTT 7,8 Monaten
- VH1-39 mit einer medianen TTT 18,6 Monaten

3.5 *IGHV*-Gruppen mit besonders langer TTT

Für folgende *IGHV* Subtypen ermittelten wir eine besonders lange mediane TTT:

- VH1-2 mit einer medianen TTT von 70,3 Monaten
- VH3-21 mit einer medianen TTT von 70,3 Monaten
- VH1-69 mit einer medianen TTT von 54,4 Monaten
- VH1-18 mit einer medianen TTT von 58,9 Monaten

3.6 Ausgeprägter Unterschied einer TTT einer *IGHV*-Subgruppe im Vergleich mit allen übrigen Patienten der Gesamtkohorte

3.6.1 VH1-46

Die *IGHV*-Subgruppe VH1-46 (n=5) zeigte mit einer medianen TTT von 9,5 Monaten keinen signifikanten Unterschied zu einer kürzeren TTT im Vergleich zu der restlichen Gesamtkohorte (n=313) mit 70,3 Monaten ($P=0,881$).

3.6.2 VH4-39

Die *IGHV*-Subgruppe VH4-39 (n=13) zeigte mit einer medianen TTT von 28,8 Monaten keinen signifikanten Unterschied zu einer kürzeren TTT im Vergleich zu der restlichen Gesamtkohorte (n=305) mit 70,3 Monaten ($P=0,441$).

3.6.3 VH4-4

Die *IGHV*-Subgruppe VH4-4 (n=11) zeigte mit einer medianen TTT von 25,9 keinen signifikanten Unterschied zu einer kürzeren TTT im Vergleich zu der restlichen Gesamtkohorte (n=307) mit 70,3 Monaten ($P=0,703$).

3.6.4 VH3-1

Die *IGHV*-Subgruppe VH3-1 (n=7) zeigte mit einer medianen TTT von 7,8 Monaten eine signifikant kürzere TTT im Vergleich zu der restlichen Gesamtkohorte (n=311) mit 70,3 Monaten ($P=0,017$).

3.7 Einfluß von *IGHV*-Subgruppen auf die TTT bei Patienten mit mutiertem *IGHV*-Status

Um zu überprüfen, ob wie für den *IGHV*-Subtyp VH3-23 auch für weitere *IGHV*-Subtypen trotz mutiertem *IGHV*-Status eine Assoziation mit einem kürzeren TTT besteht und diese nicht nur durch kleine Fallzahlen verborgen ist, wurden die o.g. *IGHV*-Subtypen mit besonders kurzer TTT zusammengefaßt und mit den anderen Fällen verglichen. Ferner wurden 136 Fälle mit unmutiertem *IGHV*-Status in den Vergleich mit einbezogen. Es resultierten die Untergruppen unmutiert, mutiert ungünstig (alle Fälle aus 3.4), *IGHV*-Subtyp VH3-21 sowie mutiert günstig (alle weiteren mutierten Fälle).

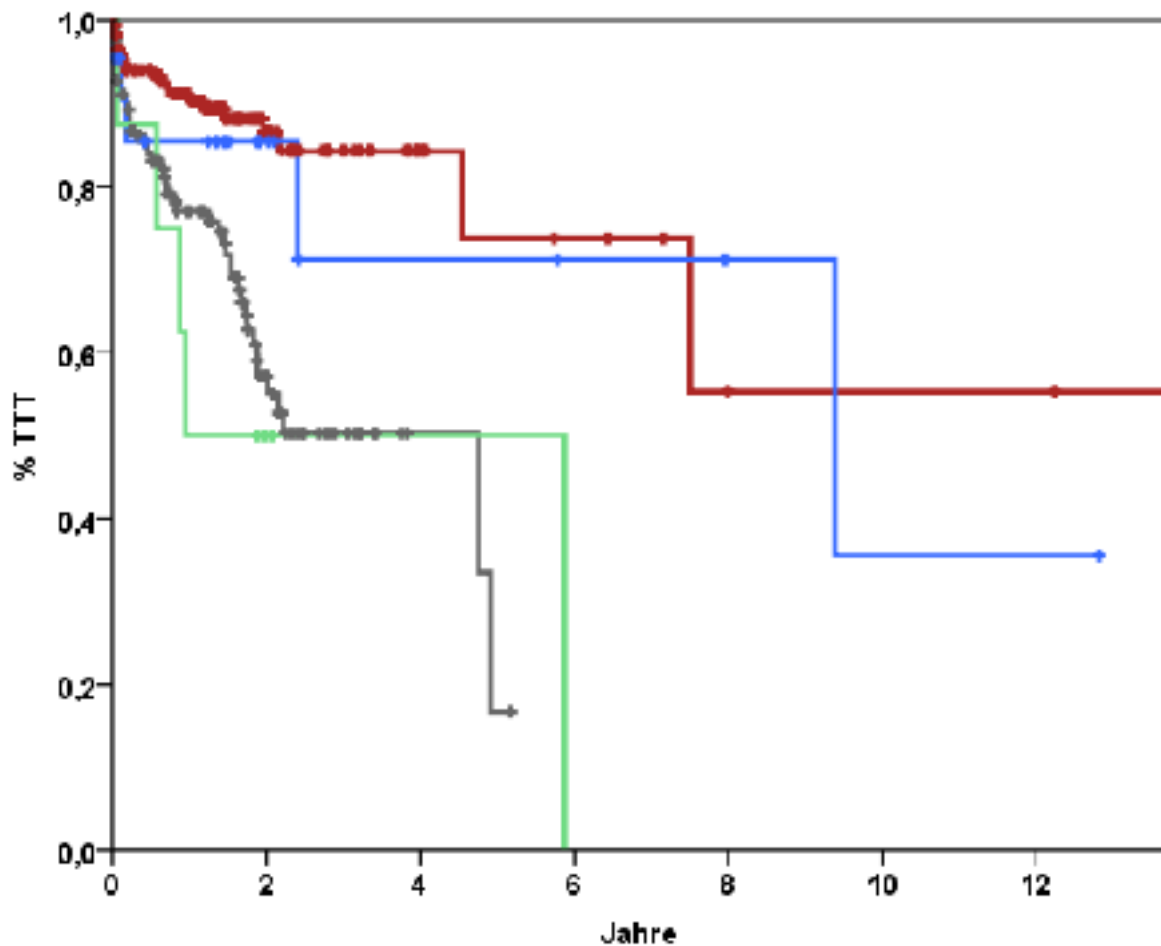


Abb. 5: TTT von *IGHV* unmutiert (grau), mutiert günstig (rot), mutiert ungünstig ohne VH3-21 (blau) sowie von VH3-21 (grün) allein.

Diese Auswertung zeigt, dass wie vorbekannt Patienten mit VH3-21 eine der unmutierten Kohorte vergleichbare TTT aufweisen. Diese Aussage ist mit $P=0,039$ im Vergleich zu allen anderen Fällen signifikant. Die Auswertung der mutierten Kohorte versus der Untergruppe „mutiert ungünstig ohne *IGHV*-Subtyp VH3-21“ zeigt ebenfalls einen Unterschied mit kürzerer TTT für letztere Gruppe (TTT bei 3 Jahren: 84% vs. 71%, $P=0,362$).

4. Diskussion

Die CLL ist eine sehr heterogene Krankheit, die Überlebensspanne liegt zwischen wenigen Monaten und mehreren Dekaden. Da es sich um die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter handelt und die Inzidenz vor allem bei älteren Patienten recht hoch ist, sind intensive Bemühungen unternommen worden, diese Heterogenität besser zu verstehen [Swerdlow H. et al., 2008]. Die bekanntesten Prognosemarker sind unter anderen Serummarker (Beta-2-Mikroglobulin, Thymidinkinase) [Hallek et al., 1999], dann aber auch zytogenetische Veränderungen wie etwa eine Trisomie 12 oder eine 13q-Deletion [Döhner H. et al.; 2000] oder molekulare Parameter wie der IGHV-Mutationsstatus [Rozman et al., 1995; Montserrat et al., 1995]. In der Ausreifung lymphatischer Zellen treten Rearrangements in den Genen auf, welche die schweren Ketten der Immunglobuline (IGHV) bilden. Hierbei können Mutationen in der variablen Region der Immunglobuline auftreten. In Abhängigkeit des IGHV-Mutationsstatus können CLL-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Hier werden Patienten mit einem unmutiertem IGHV-Status sowie Patienten mit einem mutiertem IGHV-Status unterschieden. Dabei weisen Patienten mit einem unmutiertem IGHV-Status eine kürzere TTT (Überlebenszeit) und ein kürzeres Gesamtüberleben auf als Patienten mit einem mutiertem IGHV-Status [Hallek et al., 2008]. Seit Jahren schon ist nun der IGHV-Status mit dem Tumorprotein p53 (TP53) der wichtigste prognostische Marker einer chronischen lymphatischen Leukämie [Jeromin et al., 2014]. Bereits Studien von Ritgen et al. sowie Stilgenbauer et al. aus den Jahren 2003 und 2002 beschreiben, dass eine hohe *IGHV*-Mutationsrate mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist [Ritgen et al., 2003; Stilgenbauer et al., 2002]. Ausnahme ist hier jedoch der *IGHV*-Subtyp 3-21, der unabhängig von seinem Mutationsstatus mit einer kurzen TTT sowie einem kurzen Gesamtüberleben assoziiert ist [Tobin G. et al.; 2003]. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Subtyps 3-21 wurden in einer britischen [Lin K. et al.; 2003] sowie in einer belgischen [Philippe J. et al.; 2003] Studie erzielt. Ghia et al. führten 2005 eine Studie an 553 Patienten aus dem Mittelmeerraum durch. Hier zeigte sich in nur 16 Fällen (2.9%) eine Expression des *IGHV* 3-21 Subtyps. Basierend auf einer HCDR3-Cluster Analyse wurde der *IGHV*-Subtyp 3-21 in zwei Untergruppen aufgeteilt werden. Die erste der beiden Gruppen ähnelte stark einem in einer skandinavischen Studie nachgewiesenen *IGHV* 3-21 Subtyp (Dieser *IGHV*-Subtyp VH3-21 (n=12) zeigte im Vergleich zu den restlichen Patienten (n=37) eine signifikant kürzere TTT (Median 63 vs. 147 Monate)) [Tobin et al., 2002] mit ähnlicher HCDR3 Aminosäuresequenz sowie ähnliche leichte Ketten der

Immunglobuline (IGLV)), exprimierte CD38 und wurde durch eine rasche Krankheitsprogression bestimmt. Die zweite Untergruppe fiel mit heterogenen HCDR3 Re-Arrangements, unterschiedlichen IGLV, einem ausgeglichenen Mutationstatus (5 unmutiert vs. 4 mutiert) sowie einer ausgeglichenen CD38 Expression auf. In dieser Gruppe wurden unterschiedliche klinische Verläufe (nur vier der Patienten dieser Untergruppe hatten im Rahmen dieser Studie eine Krankheitsprogression) beobachtet [Ghia P. et al.; 2005]. Das stark ausgeprägte Nord-Südgefälle bezüglich des *IGHV*-Subtyp 3-21 lässt sich wohl am ehesten durch die regional unterschiedlich starke Expression der zweiten Untergruppe im Repertoire der peripheren B-Zellen erklären. Bomben et al. untersuchten 2010 den *IGHV*-Status einer Kohorte von 1426 CLL-Patienten. Hier fiel als zweithäufigster der *IGHV*-Subtyp 3-23 numerisch nur bedingt auf (n=134), weitaus interessanter war der hohe Mutationsstatus (n=109) sowie der unabhängig von den zytogenetischen Veränderungen extrem schlechte klinische Verlauf [Bomben R. et al, 2010]. Im Rahmen dieser Studie wurde festgestellt, dass es aufgrund des vermehrten Auftretens der Micro-RNA's miR-15A und miR-16-1 zu einer Downregulierung des Tumorsuppressorgens PDCD4 [Wang Q. et al.; 2008] und RASSF5 [Moshnikova A. et al.; 2006] [Price LS. et al.; 2004] sowie des Pro-apoptotischen Faktors TIA1 [Forch P. et al.; 2001] kommt. In direkten Bezug wird hier das schlechteste klinische outcome aller CLL-Patienten in dieser Studie gestellt. Weiteres konnte hier ein deutlich erniedrigtes Vorkommen der Tyrosinkinase ZAP-70 bei den Patienten mit mutiertem *IGHV* 3-23 Status nachgewiesen werden. Zusammengefasst fällt hier eine Heterogenität innerhalb der mutierten *IGHV*-Subtypen auf.

Die vorliegende Arbeit ging nun der Frage nach, inwieweit innerhalb der bereits prognostisch günstigen Subgruppe der CLL-Patienten mit einem mutierten *IGHV*-Status eine noch detailliertere Prognoseabschätzung möglich sein könnte. Dazu wurde die „time to treatment“ (TTT) von 348 CLL-Patienten mit verschiedenen Subtypen klonaler *IGHV*-Rearrangements verglichen. Die *IGHV*-Subtypen wurden mit den zytogenetischen Veränderungen korreliert, wobei in die statistische Auswertung nur *IGHV*-Subtyp-Gruppen ab einer Größe von mindestens 5 Fällen einbezogen wurden. Am häufigsten waren die folgenden *IGHV*-Subtypen: VH1-69 (n=42; 12,6%), VH4-34 (n=32; 9,6%), VH3-23 (n=29; 8,7%), VH3-21 (n=24; 7,2%), VH3-30 (n=17; 5,1%), VH1-2 (n=14; 4,2%), VH4-39 (n=14; 4,2%), VH3-33 (n=12; 3,6%), VH4-4 (n=11; 3,3%), VH3-74 (n=11; 3,3%), VH3-48 (n=10; 3,0%), VH2-5 (n=8; 2,4%) VH3-11 (n=7, 2,1%), VH1-3 (n=7; 2,1%), VH1-18 (n=7; 2,1%), VH1-46 (n=6; 1,8%), VH4-59 (n=6; 1,8%) sowie VH3-72 (n=5; 1,5% aller untersuchten Patienten). Weiteres wurden Patienten mit mutiertem *IGHV*-Status auch hinsichtlich der

zytogenetischen Veränderungen nach den Ergebnissen der FISH-Analyse untersucht, ob einer entsprechenden Korrelation ein prognostischer und somit für die Therapie relevanter Einfluss zukommt. Hier ergab sich, dass die 13q14 Deletion (als solitäre oder kombinierte Aberration) die häufigste Veränderung war. Dies ist auch in Übereinstimmung mit der Literatur zu sehen (Döhner et al.; 2000). Weitere rekurrente Veränderungen waren eine 11q22.3-Deletion (*ATM*), Trisomie 12, Translokation t(11;14)(q13;q32)/*IGH-CCND1* sowie 17p13-Deletion. Die häufigsten *IGHV*-Subtypen wurden mit den zytogenetischen Veränderungen korreliert. Eine signifikante Assoziation konnte zwischen VH3-7 und einer Trisomie 12 ($P=0,001$), zwischen VH4-4 und einer 13q-Deletion als einzige Deletion ($p=0,031$) sowie zwischen VH3-43 und einer 11q-Deletion ($P=0,013$) in der FISH-Analyse nachgewiesen werden. Ferner zeigten sich (allerdings nicht-signifikante) Korrelationen zwischen VH4-39 und einer 13q-Deletion ($P=0,079$), zwischen VH4-31 ($P=0,120$) sowie VH5-a ($P=0,072$) und einer Trisomie 12, zwischen VH1-46 ($P=0,142$) sowie VH 4-34 ($P=0,150$) und einer 11p-Deletion, zwischen VH1-18 ($P=0,066$), VH3-70 ($P=0,063$) sowie VH 4-31 ($P=0,063$) und einer 17p-Deletion als auch zwischen VH1-2 und einem *IGH-CCND1-Rearrangement* ($P=0,082$). Im Anschluss wurde der prognostischen Aussagekraft der verschiedenen *IGHV*-Subtypen nachgegangen. Hier zeigte sich, dass der *IGHV*-Subtyp VH3-11 mit einer signifikant kürzeren TTT assoziiert (Median 7,8 vs. 70,3 Monate; $P=0,017$) und somit ungünstig war. Ferner zeigte sich nicht signifikant eine kürzere TTT für die *IGHV*-Subtypen VH1-46 ($P=0,881$), VH4-39 ($P=0,441$) und VH4-4 ($P=0,703$). Des Weiteren wurden unter Punkt 3.7 anhand Ihrer TTT die Untergruppen unmutiert, mutiert günstig, mutiert ungünstig ohne *IGHV*-Subtyp VH3-21 sowie der alleinigen *IGHV*-Subtyp VH3-21 gebildet. Diese Daten wurden untersucht um zum einen nachzuweisen, dass wie vorbekannt Patienten mit VH3-21 eine der unmutierten Kohorte vergleichbare TTT aufweisen. Von Interesse war außerdem die TTT der Untergruppe „mutiert ungünstig ohne *IGHV*-Subtyp VH3-21 vs. der TTT der mutierten Kohorte. Aufgrund der geringen Patientenzahl in unserer Studie haben wir basierend auf eine ähnliche TTT Subgruppen zusammengefasst. Das Ziel war es, größere prognostisch homogene Gruppen zu formen und somit die Aussagekraft zu erhöhen. Auch hier wurden in die statistische Auswertung nur *IGHV*-Subtyp-Gruppen ab einer Größe von mindestens 5 Fällen einbezogen. Es konnte signifikant ($P=0,039$) nachgewiesen werden, dass Patienten trotz eines mutierten VH3-21-Status eine TTT entsprechend der unmutierten Kohorte aufweisen. Die weiteren Vergleiche ergaben immer eine bessere TTT für die Kohorte ohne den Subtyp VH3-21, jedoch ohne Signifikanz. Basierend auf der bereits erfolgten Zusammenfassung von

Subgruppen zur Verstärkung der Aussagekraft ist aufgrund der fehlenden Signifikanz diesem Ergebnis kein Wert beizumessen und besitzt somit keinen Prognosewert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientenkohorte mit mutierten *IGHV*-Status zeigt signifikant ($P=0,039$), dass Patienten mit VH3-21 trotz mutierten *IGHV*-Status eine TTT vergleichbar einer unmutierten Kohorte aufweisen. In einer Studie von Baliakis et al. wurden insgesamt 3490 CLL-Patienten mit mutiertem und unmutiertem *IGHV*-Status untersucht. Auch hier wurde festgestellt, dass CLL-Patienten mit unmutiertem *IGHV*-Status bezüglich Ihrer TTT einen ähnlichen klinischen Verlauf hatten wie Patienten, unabhängig Ihres *IGHV*-Status, mit bekannt unvorteilhaften genomischen Mutationen (*NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*). Weiteres wurde festgestellt, dass CLL-Patienten mit mutiertem *IGHV*-Status mit isolierter 13q-Deletion („13q sole“) oder ohne genomische Mutationen im Vergleich zur CLL mit unmutiertem *IGHV*-Status mit einem ähnlichen genomischen Hintergrund signifikant überlegen war. [Baliakas et al., 2015 b]. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Auch wir konnten unter Punkt 3.7 nachweisen, dass Patienten mit VH3-21 eine der unmutierten Kohorte vergleichbare TTT aufweisen. Bezüglich der TTT zeigte sich bei der *IGHV*-Subgruppe VH3-21 ($n=24$) eine im Vergleich zu den restlichen Patienten ($n=294$) kürzere TTT (Median 70,3 vs. 89,9 Monate; $P=0,248$). Jeromin et al. haben im Rahmen Ihrer Studie eine Kohorte von 1160 Patienten neben dem CLL-Tumormarkern p53 (*TP53* Mutation und del 17p13) und dem *IGHV*-Mutationsstatus neue vielversprechende Prognosemarker (*SF3B1*, *NOTCH1*, *FBXW7*, *MYD88* und *XPO1*) untersucht. Mutationen in *SF3B1* und *NOTCH1* korrelieren mit einer kürzeren TTT sowie einem kürzeren Gesamtüberleben. Eine klare Aussage der prognostischen Wertbarkeit von *FBXW7*, *MYD88* und *XPO1* aufgrund der meist niedrigen Mutationsrate von unter 10% konnte bis dato nicht getroffen werden. Im Rahmen dieser Studie wurde festgestellt, dass neben dem klassischen CLL-Prognosemarker p53 (Deletion von 17p13) und dem *IGHV*-Mutationsstatus auch *SF3B1* einen signifikanten Prognosenwert besitzt und empfiehlt *SF3B1* als Standard CLL-Prognosemarker zu verwenden [Jeromin et al., 2014]. Stilgenauer et al. bestätigen hier die Aussage von Jeromin et al. und werten *SF3B1* neben den klassischen CLL-Tumormarkern p53 (Deletion von 17p13) und dem *IGHV*-Mutationsstatus als einen unabhängigen Prognosemarker [Stilgenauer et al., 2014]. Obwohl im Rahmen unserer Studie aufgrund der kleinen Fallzahl in Bezug auf den Prognosemarker p53 nur eine Aussage betreffend der Häufigkeit ($n=21/333$ Patienten, 6,3%) gemacht werden kann, zeigt sich eine im Vergleich mit anderen Studien (bei Jeromin et al. 7,1%) eine ähnliche Häufigkeit. Des Weiteren zeigt sich trotz unterschiedlich

angelegter Kohorten (mutiert vs. mutiert / unmutiert) eine relativ ähnliche Häufigkeitsverteilung von p53 mit unserer Studie (6,3% vs. 4,1% [Jeromin et al., 2014] vs. 10,4% [Baliakas et al., 2015 b]). Zusätzlich fällt neben dem p53-Häufigkeitsvergleich mit Jeromin et al. eine weitere z.T. ähnliche Häufigkeitsverteilung der zytogenetischen Subgruppen 11q-Deletion (del11q 11,4% vs. del11q Jeromin et al. 11,5%), Trisomie 12 (Trisomie 12 12,0% vs. Trisomie Jeromin et al. 14,8%) sowie 13q-Deletion (del 13q 63,2% vs. del13q Jeromin et al. 60,1%) auf.

Ein weiterer neuer Prognosemarker ist *BIRC3*. *BIRC3* (baculoviral IAP repeat-containing 3) ist auf dem Chromosom 11q22.2 lokalisiert, liegt 6 Basenpaare (Mb) neben dem *ATM*-Gen (11q22) und ist ein Apoptose-Inhibitor. Deletionen auf dem Chromosom 11q22-23 korrelieren ebenso wie *SF3B1* sowie *NOTCH 1* mit einer kürzeren TTT und einem kürzeren Gesamtüberleben. Alhourani et al. haben *BIRC3*-Alterationen bei 117 CLL-Patienten sowie 45 B-ALL-Patienten untersucht [Alhourani et al., 2016]. Das Ziel dieser Studie war der Nachweis einer *BIRC3*-Deletion als geeigneter CLL-Prognosemarker sowie die Untersuchung der Hypothese, dass *BIRC3*-Deletionen immer mit *ATM*-Deletionen kombiniert sind. *BIRC3*-Gene-Variationen konnten bei insgesamt 23/117 (19,6%) CLL-Patienten nachgewiesen werden, *ATM*-Deletionen bei 20/117 (17,0%) der CLL-Patienten. Insgesamt konnten parallel nur 3 *BIRC3*-Deletionen in Kombination mit *ATM*-Deletionen nachgewiesen werden. Zusammengefasst kann trotz der räumlichen Nähe des *BIRC3*-Gens zum *ATM*-Gen nur selten von einer kombinierten *BIRC3-ATM*-Deletion ausgegangen werden, des weiteren scheidet *BIRC3* wohl wegen der eher niedrigen Frequenz als „First-line“-Prognosemarker aus [Alhourani et al., 2016]. Eine Studie von Rossi et al. bestätigt Alhourani et al.. Hier wurden *BIRC3*-Deletionen bei der Erstdiagnose einer CLL nur bei 4% der Patienten nachgewiesen, jedoch bei 24% der Patienten mit einer Fludarabin-refraktären CLL [Rossi et al., 2012]. Diesbezüglich ist *BRIC3* auf jeden Fall ein Marker, der zur weiteren Therapieplanung nachgewiesen werden sollte. Moderne Studien beschäftigen sich mit der Stereotypie im B-Zell-Rezeptor, das bedeutet dass Patienten mit ähnlichen *IGHV*-Mustern nahezu identische Immunglobuline im B-Zell-Rezeptor aufweisen. Bestimmte Immunglobulin-Gene sind bevorzugt bei unmutierten *IGHV*-Subtypen nachzuweisen (z.B. *IGHV* 1-69), während wiederum andere vermehrt bei mutierten *IGHV*-Subtypen (z.B. *IGHV* 4-34) auftreten. Patienten mit einer Stereotypie tragen Sequenzen mit mutiertem und unmutiertem Repertoire. Stamatopoulis et al. haben in einer Studie mit 916 CLL-Patienten nachgewiesen, dass 21,9% der Kohorte stereotype B-Rezeptoren hatten [Stamatopoulis et al., 2015]. Baliakas et al. weisen mit Ihrer Studie

nach, dass Patienten mit einem stereotypen *IGHV*-3-21-Rearrangement unabhängig ihres Mutationsstatus eine erheblich niedrigere TTT aufweisen [Baliakas et al., 2015 a]. Patienten mit einer Stereotypie des mutierten *IGHV*-3-21 Subtyps hatten eine TTT von 22 Monaten, Patienten mit einer Stereotypie des unmutierten *IGHV*-3-21 Subtyps hatten eine TTT von 24 Monaten. Im Vergleich dazu hatten Patienten mit einem mutierten *IGHV* 3-21-Subtyp eine TTT von 60 Monaten [Baliakas et al., 2015 a]. Sichtet man diese Daten, so kommt der Stereotypie eine deutliche Aussagekraft zu und sollte neben dem *IGHV*-Mutationstatus als Prognosemarker diskutiert werden.

Da es sich hier um europäische Studien handelt, ist von einem größtenteils europäischen Patientengut auszugehen. Möglicherweise können hier im Rahmen größerer Studien signifikante Ergebnisse bezüglich einer regionalen Häufigkeitsverteilung erwartet werden. Aufgrund des klinischen Nachweises der prognostischen Aussagekraft betreffend des *IGHV*-Mutationstatus hatte die vorliegende Arbeit das Ziel, innerhalb der prognostisch günstigen Kohorte mit mutiertem *IGHV*-Status in Korrelation mit zytogenetischen Veränderungen *IGHV*-Subtypgruppen mit einem abweichenden Prognosewert nachzuweisen. Jedoch konnten auch hier aufgrund der relativ kleinen Fallzahl keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der *IGHV*-Subtypen stellt sich daher ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur als schwierig dar, da in den vorliegenden Arbeiten aus der Literatur in der Regel unselektierte Kohorten von CLL-Patienten hinsichtlich der Expression bestimmter *IGHV*-Subtypen analysiert wurden [Galligan et al., 2008; Marasca et al., 2007; Bomben et al., 2010; Wang et al., 2008; Moshnikova et al., 2006; Price et al., 2004; Forch et al., 2001; Tobin et al., 2003; Lin et al., 2003; Philippe et al., 2003; Stilgenauer et al., 2014; Baliakas et al., 2015 a/b; Jeromin et al., 2014-; Alhourani et al., 2015; Stamatopoulis et al., 2015]. Nachweislich zeigen sich jedoch in der vorliegenden Arbeit prognostische Trends innerhalb der mutierten *IGHV*-Subgruppen, die im Rahmen zahlenmäßig größer angelegten Studie zu beweisen wären.

Zusammenfassend ergeben sich durch die Bestimmung der *IGHV*-Subtypen bei Patienten mit mutiertem Immunglobulingenstatus keine signifikanten Einflüsse auf den klinischen Verlauf. Dies mag jedoch künftig zur detaillierteren Risikostratifizierung innerhalb dieser an und für sich günstigen Prognosegruppe Bedeutung finden. CLL-Studiengruppen sollten künftig nicht nur der Unterscheidung zwischen Patienten mit mutiertem und unmutiertem *IGHV*-Status Beachtung schenken, sondern sich auf die Bedeutung der einzelnen *IGHV*-Subtypen bei Patienten mit positivem Mutationsstatus konzentrieren. Der vor zwei Jahren

auf dem Markt erschienene humanisierte monoklonale Antikörper Obinutuzumab, der vor allem bei therapieresistenten Formen einer CLL sowie eines Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt wird, hat auch bei Patienten mit einem unmutiertem *IGHV* Status erfreuliche Resultate erzielt. Ein weiteres seit September 2014 zugelassenes Medikament ist Idelalisib, ein Hemmstoff der Phosphatidylinositol-3-Kinase p110, welches in Kombination mit Rituximab oral verabreicht wird. Es führt zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Hazard Ratio 0,14) bei Patienten mit del17p oder Mutation TP53 sowie zu einer Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit bei Patienten mit Progress innerhalb von 24 Monaten nach der letzten Vortherapie und mit Komorbidität (Hazard Ratio 0,22) und bei Patienten mit del17p oder Mutation TP53 (Hazard Ratio 0,16) [Furman et al., 2014].

Um solche Erfolge zu rechtfertigen und weiter zu tragen, ist es wichtig, weiter spezifische Therapiekonzepte zu entwickeln und diese wie einen Handschuh an die Bedürfnisse der CLL Erkrankung des einzelnen Patienten anzupassen. Gerade deswegen sollten neben den großen CLL-Prognosemarkern der einzelne *IGHV*-Subtyp nicht aus den Augen gelassen werden, um dem Patienten eine möglichst starke Personalisierung der CLL-Therapie mit dem daraus hoffentlich für den Patienten besten Outcome anbieten zu können.

5. Zusammenfassung

Bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) gilt ein mutierter Immunglobulingen-Status (*IGHV*-Status) als prognostisch günstig. Unklar ist, ob den verschiedenen *IGHV*-Mutations-Subtypen, welche auf molekularer Basis unterschieden werden können, ein prognostischer Einfluss zukommt.

Diese Arbeit untersuchte zunächst die Frequenzen verschiedener *IGHV*-Mutationssubtypen bei 348 CLL-Patienten mit mutiertem *IGHV*-Status. Darüber hinaus untersuchte sie den prognostischen Einfluss der häufigsten *IGHV*-Mutations-Subtypen. Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die verschiedenen *IGHV*-Mutationssubtypen mit den zytogenetischen Veränderungen nach den Ergebnissen der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) korrelieren. Hierbei zeigten sich, wobei in die statistische Auswertung nur *IGHV*-Subtyp-Gruppen ab einer Größe von mindestens 5 Fällen einbezogen wurden, am häufigsten die folgenden *IGHV*-Subtypen in unserer Kohorte: VH1-69 (n=42; 12,6%), VH4-34 (n=32; 9,6%), VH3-23 (n=29; 8,7%), VH3-21 (n=24; 7,2%), VH3-30 (n=17; 5,1%), VH1-2 (n=14; 4,2%), VH4-39 (n=14; 4,2%), VH3-33 (n=12; 3,6%), VH4-4 (n=11; 3,3%), VH3-74 (n=11; 3,3%), VH3-48 (n=10; 3,0%), VH2-5 (n=8; 2,4%), VH3-11 (n=7; 2,1%), VH1-3 (n=7; 2,1%), VH1-18 (n=7; 2,1%), VH1-46 (n=6; 1,8%), VH4-59 (n=6; 1,8%) sowie VH3-72 (n=5; 1,5% aller untersuchten Patienten). Bezüglich der zytogenetischen Veränderungen bei Patienten mit mutiertem *IGHV*-Status ergab sich, dass die solitäre oder kombinierte 13q14 Deletion die häufigste Veränderung war. Des weiteren wurden die häufigsten *IGHV*-Subtypen mit den zytogenetischen Veränderungen korreliert. Dabei wurden o.g. *IGHV*-Subtypen, welche bei 5 oder mehr Patienten festgestellt wurden, einbezogen. Eine signifikante Assoziation konnte zwischen VH4-4 und einer 13q-Deletion als einziger Deletion ($P=0,031$), zwischen VH3-7 und einer Trisomie 12 ($P=0,001$) sowie zwischen VH3-43 und einer 11q-Deletion ($P=0,013$) in der FISH-Analyse nachgewiesen werden. Des weiteren konnte ein Trend zwischen VH4-39 und einer 13q-Deletion ($P=0,079$), VH4-31 und einer Trisomie 12 ($P=0,120$), VH5-a und einer Trisomie 12 ($P=0,072$), VH 4-34 und einer 11p-Deletion ($P=0,150$), VH1-46 und einer 11p-Deletion ($P=0,142$), VH1-18 und einer 17p-Deletion ($P=0,066$), VH 3-70 und einer 17p-Deletion ($P=0,063$), VH4-31 und einer 17p-Deletion ($P=0,063$) sowie VH1-2 und einem IGH-CCND1-Rearrangement ($P=0,082$) aufgezeigt werden. Bezüglich der prognostischen Aussagekraft der verschiedenen *IGHV*-Subtypen zeigte sich, dass der *IGHV*-Subtyp VH3-11 mit einer signifikant kürzeren TTT assoziiert (Median 7,8 vs. 70,3

Monate; $P=0,017$) und somit ungünstig war. Ferner zeigten sich nicht signifikant eine kürzere TTT für die IGHV-Subtypen VH1-46 ($P=0,881$), VH4-39 ($P=0,441$) und VH4-4 ($P=0,703$).

Die häufig fehlende Signifikanz ist mit Sicherheit auf die relativ kleine Patientenzahl im Rahmen dieser Studie zurückzuführen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass mit einer deutlich größeren Patientengruppe sich die prognostische Signifikanz deutlich verbessern könnte.

Diese Promotionsarbeit beinhaltet die Auswertung der klinischen Daten sowie die Durchführung und Interpretation der statistischen Daten anhand der bereits vorliegenden Ergebnisse der genetischen Untersuchungen.

6. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Matutes-Score für die B-CLL.	08
Tab. 2: Einteilung nach Binet.	12
Tab. 3: Rai-Klassifikation.	12
Tab. 4: Indikationen zur Therapie bei Patienten mit einer CLL nach dem „International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia“ (IWCLL) 2007.	13
Tab.5: Kombinationstherapien mit Fludarabin.	14
Tab. 6.0: Anzahl der Patienten mit bestimmten <i>IGHV</i> -Subtypen sowie Frequenz in der Gesamtkohorte.	27
Tab. 6.1: Darstellung aller 19 <i>IGHV</i> -Subtypen, welche bei mindestens fünf Patienten nachgewiesen wurden. Die Tabelle gibt die Anzahl der betroffenen Patienten sowie die Frequenz in der Gesamtkohorte an.	29
Tab. 6.2: Zuordnung des Altersmittelwertes zu den einzelnen <i>IGHV</i> -Subtypen sowie im Vergleich zur Gesamtkohorte.	33
Tab. 6.3: Geschlechtsverteilung innerhalb der häufigen <i>IGHV</i> -Subtypen	33
Tab. 6.4: Zytogenetische Veränderungen im Vergleich zur Gesamtkohorte	33
Tab. 6.5: Mediane „time to treatment“ (TTT) bei verschiedenen <i>IGHV</i> -Subtypen.	33

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Nachweis einer Trisomie 12 bei einem Patienten mit einer CLL in der Chromosomenbänderungsanalyse.

19

Abb. 2: Nachweis einer Trisomie 12 bei einem Patienten mit CLL mittels der FISH-Analyse.

21

Abb. 3: Schema eines Durchflusszytometers für die multiparametrische Durchflusszytometrie (Epics XL-MCL, Beckman Coulter).

24

Abb. 4: Charakteristische durchflusszytometrische Befunde bei CLL und Mantelzelllymphom.

Abbildung oben: Ein Fall von CLL mit Negativität für CD79b und FMC7, Positivität für CD23 und schwacher Fluoreszenzintensität der restringierten Leichtketten.

Abbildung unten: Ein Fall von Mantelzelllymphom mit Expression von CD79b und FMC7, Negativität von CD23 und stärkerer Fluoreszenzintensität der Leichtketten.

25

Abb. 5: TTT von IGHV unmutiert, mutiert ungünstig mit VH3-21, mutiert ungünstig ohne VH3-21 sowie von VH3-21 allein.

42

8. Literaturverzeichnis

Alhourani E., Othman M.A., Melo J.B., Carreira I.M., Grygalewicz B., Vujic D., Zecevic Z., Joksic G., Glaser A., Pohle B., Pohle B., Schlie C., Hauke S., Lier T. : BIRC3 alterations in chronic and B-cell acute lymphocytic leukemia patients. *Oncol Lett.* 2016 May;11(5): 3240-3246.

Anger C., Fink R., Fleischer J.: Vergleichsuntersuchungen zwischen Cytostasan (Bendamustin) und Cyclophosphamid bei der chronischen Lymphadenose, dem Plasmozytom, der Lymphgranulomatose und dem Bronchialkarzinom. *Etsch. Gesundheitswesen*, 1975. 30: 1280-1285.

Bomben R., Dal-Bo M., Benedetti D. Capello D., Forconi F., Marconi D., Bertoni F., Maffei R, Laurenti L., Rossi D., Del Principe M.I., Luciano F., Sozzi E., Cattarossi I., Zucchetto A., Rossi F.M., Bulian P., Zucca E., Nicoloso M.S., Degan M., Marasca R., Efremov D.G., Del Poeta G., Gaidano G., Gattei V.: Expression of mutated IGHV3-23 in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin Cancer Res*, 2010; 16(2), 620-628.

Byrd J.C., Peterson B.L., Morrison V.A., Park K., Jacobson R., Hoke E., Vardiman J.W., Rai K., Schiffer C.A., Larson R.A.: Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from cancer and Leukemia Group B 9712(CALGB 9712). *Blood*, 2003; 101(1), 14-16.

Baliakas P., Agathangelidis A., Hadzidimitriou A., Sutton L.A., Minga E., Tsanousa A., Scarfò L., Davis Z., Yan X.J., Shanafelt T., Plevova K., Sandberg Y., Vojdeman F.J., Boudjogra M., Tzenou T., Chatzouli M., Chu C.C., Veronese S., Gardiner A., Mansouri L., Smedby K.E., Pedersen L.B., Moreno D., Van Lom K., Giudicelli V., Francova H.S., Nguyen-Khac F., Panagiotidis P., Juliusson G., Angelis L., Anagnostopoulos A., Lefranc M.P., Facco M., Trentin L., Catherwood M., Montillo M., Geisler C.H., Langerak A.W., Pospisilova S., Chiorazzi N., Oscier D., Jelinek D.F., Darzentas N., Belessi C., Davi F., Ghia P., Rosenquist R., Stamatopoulos K.: Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015 Jan 29;125(5):856-9.

Baliakas P., Hadzidimitriou A., Sutton L.A., Rossi D., Minga E., Villamor N., Larrayoz M., Kminkova J., Agathangelidis A., Davis Z., Tausch E., Stalika E., Kantorova B., Mansouri L., Scarfò L., Cortese D., Navrkalova V., Rose-Zerilli M.J., Smedby K.E., Juliusson G., Anagnostopoulos A., Makris A.M., Navarro A., Delgado J., Oscier D., Belessi C., Stilgenbauer S., Ghia P., Pospisilova S., Gaidano G., Campo E., Strefford J.C., Stamatopoulos K., Rosenquist R.: Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2015 Feb) 29(2):329-36 (b)

Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F.: (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derives from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981 Jul 1;48(1):198-206.

Böttcher S., Ringen M., Pott C., Brüggemann M., Raff T., Stilgenbauer S., Döhner H., Dreger P., Kneba M.: Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2004; 18, 10, 1637-45.

Cartwright R.A.: Summary of epidemiology and immunobiology. In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & E. Zenger). USPHS 1997, Atlanta, GA; 215–222

Cheson B.D., Bennett J.M., Grever M., Kay N., Keating M.J., O'Brien S., Rai K.R.: National Cancer Institute sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 1996; 87(12), 4990-7

Chudoba I., Plesch A., Lörch T., Lemke J., Claussen U., Senger G.: High resolution multicolor banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.*, 1999; 84(3-4), 156-160.

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. *New England Journal of Medicine*, 2003; 348(18), 1764-75

Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., Kern W., Schoch C.: Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 32 CLL cases with correlation to FISH, IGHV status, and CD38 expression. *Blood*, 2006; 108(9), 3152-60

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. *New England Journal of Medicine*, 2000; 343(26), 1910-16.

Forch P., Valcarel J.: Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. *Apoptosis*, 2001; 6(6), 463-8.

Furman R.R., Sharman J.P., Coutre S.E., Cheson B.D., Pagel J.M., Hillmen P., Barrientos J.C., Zelenetz A.D., Kipps T.J., Flinn I., Ghia P., Eradat H., Ervin T., Lamanna N., Coiffier B., Pettitt A.R., Ma S., Stilgenbauer S., Cramer P., Aiello M., Johnson D.M., Miller L.L., Li D., Jahn T.M., Dansey R.D., Hallek M., O'Brien S.M.: Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2014; 370:997-1007

Gahn B., Schäfer C., Neef J., Troff C., Feuring-Buske M., Hiddemann W., Wörmann B.: Detection of Trisomy 12 and Rb-Deletion in CD34+ Cells of Patients With B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 1997; 89(12), 4275-81

Galligan L., Catherwood M.A., Matthews C.H., Morris T.C., Alexander H.D.: Mutated IgHV1-69 gene usage represents a distinct subgroup associated with indolent disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 2008; 49(4), 763-768

Geisler C., Hou-Jensen K., Jensen O.M., Tinggaard-Pedersen N., Mørk Hansen M., Hansen N.E., Holm M., Egelund Christensen B., Drivsholm A., Boye Nielsen J., Thorling K., Andersen E., Larsen J.K., Kragh Andersen P.: The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol.*, 1997; 57(4), 292-300

Ghia P., Stamatopoulos K., Belessi C., Moreno C., Stella S., Guida G., Michel A., Crespo M., Laoutaris N., Montserrat E., Anagnostopoulos A., Dighiero G., Fassas A., Caligaris-Cappio F., Davi F.: Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*, 2005; 105(4), 1678-1685

Ghia P., Rosenquiat R., Davi F.: Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins 2009, Seite 23-30

Hainsworth J.D., Sharlene L., John H.B., Houston G.A., Hermann R.C., Bradof J.E., Greco F.A.: Singel-agent Rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol*, 2003; 21(9), 1746-51

Haferlach T., Behre G., Christopeit M., Diem H., Hafersack C., Kern W., Kohlmann A., Schäfer H.E., Schnittger S.: Diagnostic Methods in Leukaemias and Lymphomas. 1. Auflage UNI-MED SCIENCE Verlag Bremen 2009, Seite 86/87

Haferlach T., Dicker F., Weiss T., Beck C., Grote-Metke A., Oruzio D., Kern W., Haferlach T.: Toward a Comprehensive Prognostic Scoring System in Chronic Lymphocytic Leukemia Based on a Combination of Genetic Parameters. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010; 49(9), 851-9

Hallek M., Cheson B., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M.J., Montserrat E., Rai K.R., Kipps T.J.: 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*, 2008; 111(12), 5446 - 5447

Hallek M., Eichhorst B., Dreger P.: Chronische lymphatische Leukämie, Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 2006

Hallek M., Emmerich B.: Chronisch lymphatische Leukämie, 4. Auflage UNI-MED SCIENCE Verlag Bremen 2009, Seite 59

Hallek M., Langenmayer I., Nerl C. et al., Knauf W., Dietzfelbinger H., Adorf D., Ostwald M., Busch R., Kuhn-Hallek I., Thiel E., Emmerich B.: Disease Progression in Early, Nonsmoldering Chronic Lymphocytic Leukemia; *Blood*, 1999; 93(5), 1732-7

Hallek M., Wanders L., Ostwald M., Busch R., Senekowitsch R., Stern S., Schick H.D., Kuhn-Hallek I., Emmerich B.: Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma; *Leuk Lymphoma*, 1996; 22(5-6), 439-447

Han T., Sadamori N., Takeuchi J., Ozer H., Henderson E.S., Bhargava A., Fitzpatrick J., Sandberg A.A.: Clonal chromosome abnormalities in patients with Waldenstrom's and CLL-associated macroglobulinemia: significance of trisomy 12. *Blood*, 1983; 62(3), 529-530.

Hoffbrand A.V., Pettit J.E., Moses P.A.H., Petit J.E.: *Grundkurs Hämatologie*, 2. Auflage Blackwell Verlag GmbH Berlin - Wien 2003, Seite 195

ISCN. In: Mitelman F., eds. *ISCN 1995, Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplements to: An international System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S. Karger; Basel; 1995

ISCN. In: Schaffer L.G., Tommerup N., eds. *ISCN 2005, An international System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S. Karger, Basel; 2005

Jeromin S., Weissman S., Haferlach C., Dicker F., Bayer K., Grossmann V., Alpermann T., Roller A., Kohlmann A., Haferlach T., Kern W., Schnittger S.: SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP 53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* (2014) 28, 108-17

Ibrahim S., Keating M., Do K.A., O'Brien S., Huh Y.O., Jilani I., Lerner S., Kantarjian H.M., Albitar M.: CD 38 Expression is an important prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2001; 97(1), 1902-3

Jeffrey M., Singer R.: Fluorescence in situ hybridization: past, present and future, Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York. *CELL SCI*, 2003; 116(14), 2833-38

Gribben J.G.: How I treat CLL up front: Institute of Cancer, Queen Mary University of London, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London, United Kingdom. *Blood*, 2010; 115(2),187-197

Ginaldi L., De Martinis M., Matutes E., Farahat N., Morilla R., Catovsky D.: Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998; 51:364-369.

Keating M.J., O'Brien S., Lerner S., Koller C., Beran M., Robertson L.E., Freireich E.J., Estey E., Kantarjian H.: Long term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*, 1998; 92(4), 1165-71

Keating M.J., Flinn I., Binet J.L., Binet J.L., Hillmen P., Byrd J., Albitar M., Brettman L., Santabarbara P., Wacker B., Rai K.R.: Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patient who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, 2002; 99(10)3555-61

Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., Andreeff M., Cortes J., Faderl S., Thomas D., Koller Ch., Wierda W., Detry M.A., Lynn A., Kantarjian H.: Early results of chemotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23, 4079-4088

Kern W., Diem H., Haferlach T.: Immunophänotypisierung in der modernen Leukämiediagnostik. *Dtsch med Wochenschr*, 2005; 130(5), 215-219.

Lin K., Manocha S., Harris R.J., Zoltan M., Sherrington P.D., Pettitt A.R.: high frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the VH3-21 gene segment. *Blood* 2003; 102(3), 1145-1146

Lothar T.: Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 7. Auflage, Frankfurt/Main 2008, S. 1938-1947.

Lozanski G., Heerema N., Flinn I., Smith L., Harbison J., Webb J., Moran M., Lucas M., Lin T., Hackbarth M.L., Proffitt J.H., Lucas D., Grever M.R., Byrd J.C.: Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*, 2004; 103(9), 3278-81
Mauro F.r. et al.; Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*, 1999. 94(2): 448-54.

Marasca R., Vaccari P., Luppi M., Zucchini P., Castelli I., Barozzi P., Cuoghi A., Torelli G.: Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C viruspositive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Pathol.*, 2001; 159(1), 253-261.

Marti G.E., Muller J., Stetler-Stevenson M., Caporaso N.: B-cell monoclonal lymphocytosis in three individuals living near a hazardous waste site. In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger). USPHS 1997, Atlanta; GA; Page 37–50

Marti G.E., Rawstron A.C., Ghia P., Hillmen P., Houlston R.S., Kay N., Schleinitz T.A., Caporaso N.: Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.*, 2005; 130(3), 325 (a)

Marti G.E., Rawstron A.C., Ghia P., Hillmen P., Houlston R.S., Kay N., Schleinitz T.A., Caporaso N.: Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.*, 2005; 130(3), 326 (b)

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

Molica S., Levato D., Dattilo A.: Natural history of early chronic lymphocytic leukemia. A single institution study with emphasis on the impact of disease-progression on overall survival. *Haematologica*, 1999. 84(12):1094-9.

Moreau E.J., Matutes E., A'Hern R.P., Morilla A.M., Morilla R.M., Owusu-Ankomah K.A. : Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108:378-382.

Moshnikova A., Frye J., Shay J.W., Minna J.D., Khokhlatchev A.V.: The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. *J Biol Chem.*, 2006; 281(12), 8143-52

Orchard J.A., Ibbotson E.I., Davis Z., Alexander H.D., Carey B.S., Farrugia J., Gardiner A., Mould S., Oscier D., Copplestone J.A., Prentice A.G.: ZAP-70 expression and

prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. Department of Haematology, Royal Bournemouth Hospital, Bournemouth, UK. *Lancet*, 2004; 363(940), 109

Panovska-Stavris I., Ivanovski M., Siljanovsky N., Cevreska L., Efremov D.G.: Chronic lymphocytic leukemia patients with a V1-69 gene rearrangement do not have inferior survival with respect to patients that express other unmutated V(H) genes. *Leuk Res.* 2007; 3(2), 245-248

Philippe J., Janssens A., Smits K.: Prognostic value of specific VH-genes in CLL. *Leuk Lymph.*, 2003; 44, 40

Pfitzner T., Reiser M., Barth S., Engert. A.: Quantitative molecular monitoring of residual tumor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 81, 258-66, 2002.

Price L.S., Bos J.L.: RAPL: taking the Rap in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5(10), 1007-8.

Rai K.R., Han T.: Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Onkol Clin North Am* 4 (1990): 447-56

Rai K.R., Rabinowe S.N. (1993): Chronic lymphocytic leukemia. In Holland J.F., Frei III E., Bast jr. K.C. Kufe D.W., Morton D.I. Weichselbaum RR (ed) *Cancer Medicine*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp1971-1988.

Rai K.R., Peterson B.L., Apfelbaum F.R., Kolitz J., Elias L., Shepherd L., Hines J., Threatte G.A., Larson R.A., Cheson B.D., Schiffer C.A.: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2000. 343(24): 1750-7.

Rawstron A.C., Kennedy B., Evans P.A.S., Davies F.E., Richards S.J., Haynes A.P., Russell N.H., Hale G., Morgan G.J., Jack A.S., Hillmen P.: Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 98, 29-35, 2001.

Ritgen M., Lange A., Stilgenbauer S., Dohner H., Bertscher C., Bosse H., Stuhr A., Kneba M., Dreger P.: Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 101:2049-2053

Robak T., Bloński J.Z., Kasznicki M., Blasińska-Morawiec M., Krykowski E., Dmoszyńska A., Mrugała-Spiewak H., Skotnicki A.B., Nowak W., Konopka L., Ceglarek B., Maj S., Dwilewicz-Trojaczek J., Hellmann A., Urański I., Zdziarska B., Kotlarek-Haus S., Potoczek S., Grieb P.: Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multi center trial. *Blood*, 2000. 96(8):2723-9.

Rondell D., Laurie F., Zinzani P.L., Raspadori D., Ventura M. A., Galieni P., Birtolo S., Forconi F., Algeri R., Tura S.: 2-Chlorodeoxyadenosine in the treatment of relapsed/refractory chronic lymphoproliferative disorders. *Eur J Haematol*, 1997. 58(51): 46-50.

Rossi D., Fangazio M., Rasi S., Vaisitti T., Monti S., Cresta S., Chiaretti S., Del Giudice I., Fabbri G., Brusca A., Spina V., Deambroggi C., Marinelli M., Famà R., Greco M., Daniele G., Forconi F., Gattei V., Bertoni F., Deaglio S., Pasqualucci L., Guarini A., Dalla-Favera R., Foà R., Gaidano G.: Disruption of BIRC3 associates with fludarabine

chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 2854-2862.

Rothe G.: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007

Rummel M.J., Stilgenbauer S., Game H.: Fludarabine versus fludarabine plus epirubicin in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL) - preliminary results of a randomized phase III multicentre study. *Blood*, 2002.100 (Supl 1)(Abstr.1489).

Sarasua S.M., Vogt R.F., Middleton D.C., Slade B.A., McGeehin M.A., Lybarger, J.A.: CLL-like' B-cell phenotypes detected in superfund studies: epidemiologic methods and findings. In: Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger). USPHS 1997, Atlanta, GA; Page 7–18

Sawitsky A., Rai K.R., Glidewell O., Silver R.T.: Comparison of daily versus intermittent chlorambucil and prednisone therapy in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1977; 50 (6), 1049-59

Stilgenbauer S., Bullinger L., Lichter P., Döhner H.: Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002.; 16:993-1007.

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 M.K., Fingerle-Rowson G., Lichter P., Cazzola M., Wendtner C.M., Fink A.M., Fischer K., Busch R., Hallek M., Döhner H.: Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014; 123(21):3247-54

Sorour A., ElSorady M.: Expression of CD38 and ZAP-70 in Chronic Lymphocytic Leukemia and their relation to clinical stage. *Journal of Medical Research Institute JMRI*, 2007; 28(2), 179

Stamatopoulos K., Belessi C., Moreno C., Boudjograh M., Guida G., Smilevska T., Belhoul L., Stella S., Stavroyianni N., Crespo M., Hadzidimitriou A., Sutton L., Bosch F., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Montserrat E., Fassas A., Dighiero G., Caligaris-Cappio F., Merle-Béral H., Ghia P., Davi F.: Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):259-70.

Stilgenbauer S., Lichter P., Döhner H.: Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2000; 4:48-72.

Swerdlow H., Campo E., Harris N., Pileri S., Stein H., Jaffe E.S.: WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer Lyon 2008, WHO Press, Seite 180

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*, 2002; 101(12), 4952-4957

Vardi A., Dagklis A., Scarfo L., Jelinek D., Newton D., Bennett F., Almeida J., Rodriguez-Caballero A., Allgood S., Lanasa M., Cortelezzi A., Orlandi E., Veronese S., Montillo M., Rawstron A., Shanafelt T., Orfao A., Stamatopoulos K., Ghia P.: Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone the more similar to CLL. *Blood*, 2013; 121(22), 4521-8

Vogt, R.F., Meredith M.N.K., Powell J., Ethridge S.F., Whitfield W., Henderson L.O. , Hannon W.H.: Results in eleven individuals with B-CLL-like phenotypes detected in environmental health studies. In: *Proceedings of a USPHS Workshop on Laboratory Approaches to Determining the Role of Environmental Exposures as Risk Factors for B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia and Other B-cell Lymphoproliferative Disorders* (ed. by G.E. Marti, R.F. Vogt & V.E. Zenger). USPHS 1997, Atlanta, GA; Seite 19–35.

Wang Q., Sun Z., Yang H.S.: Downregulation of tumor suppressor PDCD4 promotes invasion and activates both β -catenin/TCF and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene.*, 2008; 27(11), 1527-35

WHO Classification of Tumors of Haematopoetic and Lymphoid Tissues edited by Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.: 2008; Seite 180-182

9. Danksagung

Ein gesonderter Dank geht an den Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Florian Bassermann für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. phil. Thorsten Haferlach sowie Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Kern, für Ihre wohlwollende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit sowie der Überlassung des interessanten Themas.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Kern für seine zuwendende Hilfe und das in mich gesetztes Vertrauen bei der Bearbeitung bedanken. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Für die freundliche und immer schnelle Hilfe beim Finden der richtigen Papers sowie der Daten aus dem Labor möchte ich mich bei Frau Frau Tamara Alpermann bedanken.

10. Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die, der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Untersuchung der Frequenz und des prognostischen Einflusses verschiedener IGHV-Subtypen bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL)

in der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kern

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

.....