Universität Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Einfluss von SNPs auf den Krankheitsverlauf der CLL

Dissertation

zur Erlangung der Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Carolin Pfeiffer

aus Wangen im Allgäu

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Zenz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Walcher

Tag der Promotion: 6.12.2012



„Die Medizin
hat große Fortschritte gemacht.
Einige davon
sind sogar den Patienten
zugute gekommen.“

[Gerhard Kocher]

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis……..……..……..…I

Abkürzungsverzeichnis…….……....II

1. EINLEITUNG…….……..…….……..……..1

1.1. Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie……1

1.2. Die Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie…….……4

1.3. Prognosefaktoren der Chronischen Lymphatischen Leukämie……...…….7

1.4. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)……...……9

1.5. Intention der Arbeit……18

2. MATERIAL UND METHODEN……..…….……..20

2.1. Aufbau und Inhalte der klinischen Datenbank…….20

2.2. Tumorgenetik…….…….30

2.3. Statistische Methoden……..…..34

3. ERGEBNISSE…….……....……36

3.1. Der Einfluss des *MDM2*-Promotor-Polymorphismus auf den Krankheits-verlauf der CLL…….……..36

3.2. Der Einfluss des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus auf den Krankheitsverlauf der CLL……....….40

4. DISKUSSION……..…….……...…...45

5. ZUSAMMENFASSUNG……..……...…..52

6. LITERATURVERZEICHNIS……..…….…….54

7. ANHANG……..…….……...…..64

8. DANKSAGUNG……..……....…..66

9. CURRICULUM VITAE……..……..……67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CIRS	cumulative illness rating scale
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure
et al.	et alii
etc.	et cetera
FACS	fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
ggfs.	gegebenenfalls
Hb	Hämoglobin
HR	Hazard Ratio
i.e.	id est
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDT	Lymphozyten-Verdopplungszeit
LSS	leukemia specific survival
mRNA	messanger-Ribonucleinsäure
µl	Mikroliter

n.a.	not applicable
NCI	National Cancer Institute
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
n.k.	not known
nm	Nanometer
o.	oder
OS	overall survival
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SNP	single nucleotide polymorphism
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Syn.	Synonym
TFT	time to first treatment
u.	und
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
ZAP70	Zeta-assoziiertes Protein 70
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1. Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie des Erwachsenen in der westlichen Welt. Anhand von Registerdaten wird die Inzidenz in den USA auf 3,83 Fälle pro 100000 Personenjahre geschätzt. Unter Männern ist die Inzidenzrate beinahe doppelt so hoch wie unter Frauen, Afrikaner und Asiaten erkranken seltener. Fortgeschrittenes Alter und Lymphome oder Leukämien in der Familienanamnese gelten als zusätzliche Risikofaktoren (*Dores et al. 2007*).

Klinisch imponiert die CLL bei 50% der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit Lymphknotenschwellungen. Diese entstehen im Rahmen klonaler Proliferation und Akkumulation von Lymphozyten im peripheren Blut, in Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Die CLL-Zellen haben eine geringe Proliferationsrate (*Rummel 2002*), jedoch eine gegenüber normalen B-Zellen verlängerte Überlebenszeit. Unter dem Mikroskop imponieren die neoplastischen B-Zellen charakteristischerweise als kleine, reife Lymphozyten mit einem schmalen Zytoplasmasaum und einem dichten Kern ohne erkennbare Nucleoli. Im Gegensatz zu normalen B-Lymphozyten sind sie jedoch immuninkompetent. Als Gumprecht'sche Kernschatten bezeichnet man Zelltrümmer, die das morphologische Bild der CLL prägen. Die Klonalität der zirkulierenden B-Lymphozyten muss mittels Durchflusszytometrie gesichert werden (*Hallek et al. 2008*). Der Nachweis einer Coexpression des T-Zell-Antigens CD5+ und der B-Zell-Oberflächenantigene CD19+, CD20+ und CD23+ auf den neoplastischen Zellen ist hierbei pathognomonisch (siehe Tabelle 1 und Kapitel 2.1.4.).

Tabelle 1: Diagnosekriterien der CLL (nach *Hallek et al. 2008*)

Diagnosekriterien der CLL
1. Absolute Lymphozytose im peripheren Blut >5×10^9 Lymphozyten/l (5000/µl)
2. Klonalitätsnachweis mittels Durchflusszytometrie
3. Der Großteil der Lymphozyten sollten kleine und vom Aussehen her reife Zellen sein.
4. Immunphänotyp: Coexpression von CD5+, CD19+, CD20+ und CD23+

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *CD,* **c**luster of **d**ifferentiation.

Nur bei ca. der Hälfte aller Patienten treten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung CLL-bedingte Beschwerden auf. Bei den Übrigen handelt es sich um einen Zufallsbefund im Rahmen eines Routinelabors. Der Verlauf gestaltet sich höchst variabel, jedoch in der Regel indolent und oft über Jahrzehnte hinweg langsam progredient. Neben den erwähnten Lymphknotenvergrößerungen zeigen die Patienten häufig eine Splenomegalie (54%) sowie einen kompromittierten Allgemeinzustand mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit und Appetitlosigkeit, seltener B-Symptome (Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust) (*Abbott 2006*). Hautaffektionen in Form von Pruritus, Ekzemen oder knotigen Hautinfiltraten können ebenfalls Hinweise auf eine CLL sein. Infolge fortschreitender Knochenmarkinfiltration entwickeln viele Patienten Anämien, Thrombozytopenien sowie eine verstärkte Infekt-Anfälligkeit. Letztere ist neben der Neutropenie hauptsächlich durch einen Mangel an Antikörpern bedingt (*Rummel 2002*).

Als mögliche Komplikation kann eine Coombs-positive autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) auftreten, sowie in 3 bis 10% der Fälle eine sekundäre Transformation in ein höher malignes NHL mit ungünstiger Prognose (Richter-Syndrom)(*Monserrat et al. 1995*). Die Häufigkeit eines Zweitmalignoms wird auf Basis aggregierter Daten mit einer Inzidenz von 8,9% beziffert, was einer Risikoerhöhung von 28% gegenüber der Allgemeinbevölkerung entspricht (*Travis et al. 1992*).

Die Stadien-Einteilung orientiert sich an klinischen Parametern und folgt den von *Rai et al.* (*1975*) und *Binet et al.* (*1975*) vorgeschlagenen Klassifikationssystemen (siehe Tabellen 2 und 3). Diese ermöglichen eine Abschätzung von Prognose und

Therapiebedarf in fortgeschrittenen Stadien, haben hingegen für den individuellen Progress in frühen Krankheitsstadien (Binet *A* oder Rai *0 – II*) nur eine begrenzte Aussagekraft. Da sich jedoch die meisten Patienten bei Erstdiagnose gerade in diesen frühen Stadien befinden, ist die Definition zusätzlicher verlässlicher Prognose-Kriterien ein zentrales Ziel derzeitiger Forschung (*Zenz, Benner et al. 2009*).

Tabelle 2: Rai-Klassifikation der CLL (nach *Rai et al. 1975*)

Stadium	Merkmale	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
0	Nur Lymphozytose	>15
I	Lymphozytose, Lymphadenopathie	9
II	Lymphozytose, Hepato-u./o. Splenomegalie	5
III	Lymphozytose, Anämie (Hb <11g/dl)	2
IV	Lymphozytose, Thrombozytopenie <100000/µl	2

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *Hb,* Hämoglobin.

Tabelle 3: Binet-Klassifikation der CLL (nach *Binet et al. 1975*)

Stadium	Merkmale	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
A	<3 vergrößerte Lymphknotenregionen*, keine Anämie oder Thrombozytopenie	12
B	≥3 vergrößerte Lymphknotenregionen*, keine Anämie oder Thrombozytopenie	5
C	Anämie (Hb<10g/dl) und/oder Thrombozytopenie <100000/µl	2
* Als Lymphknotenregionen gelten: zervikale, axilläre oder inguinale Lymphknoten (ein- oder beidseitig), Milz oder Leber.		

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *Hb,* Hämoglobin.

1.2. Die Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie

Die Diagnose einer CLL ist nicht zwangsläufig mit einer Therapieindikation verbunden (*Hallek et al. 2008*), vielmehr ergibt sich letztere aus Klinik und Dynamik des Progresses. Diese Strategie basiert auf den Ergebnissen randomisierter Studien, die zeigten, dass eine frühzeitige Therapie weder Verlauf noch Prognose günstig beeinflusst (*Dighiero et al. 1998*). Im Rahmen von Studien wird derzeit untersucht, ob bestimmte CLL-Untergruppen, die definierte klinische und biologische Hochrisikokonstellationen aufweisen, doch von einer frühen Intervention profitieren (*Zenz, Mertens, et al. 2009*). Daher können die Kriterien für eine Therapieeinleitung variieren, je nachdem ob der Patient im Rahmen einer Studie behandelt wird oder nicht (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Empfehlungen bezüglich der **Indikationen zur Behandlung der CLL** (*Hallek et al. 2008*)

Krankheitsstadium	General practice	Klinische Studie
Rai *0*	NGI	RQ
Binet *A*	NGI	RQ
Binet *B* oder Rai *I* oder Rai *II*	Möglich*	Möglich*
Binet *C* oder Rai *III* oder Rai *IV*	Ja	Ja
aktive/progressive Erkrankung	Ja	Ja
keine aktive/progressive Erkrankung	NGI	RQ

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *General practice,* Anwendung akzeptierter Behandlungsoptionen für einen CLL-Patienten, der nicht an einer klinischen Studie teilnimmt; *NGI,* nicht generell indiziert; *RQ,* Forschungsgegenstand; *eine Behandlung ist indiziert, falls eine *aktive Erkrankung* vorliegt (Definition siehe Text).

Üblicherweise werden Patienten mit asymptomatischer Erkrankung im frühen Stadium (Rai *0*, Binet *A*) bei Erstdiagnose nicht therapiert sondern lediglich beobachtet, es sei denn sie zeigen Anzeichen einer Krankheitsprogression. Obwohl Patienten mit mittlerem (Rai *I* und *II*) und hohem (Rai *III* und *IV*) Risiko bzw. im Stadium Binet *B* oder *C* in der Regel von einer Therapieeinleitung profitieren,

können einige dieser Patienten (insbesondere in mittleren Rai-Stadien oder im Binet-Stadium *B*) ohne Therapie beobachtet werden bis sie Anzeichen einer Progression oder eine symptomatische Erkrankung entwickeln.

Eine aktive bzw. progressive CLL ist durch mindestens eines der folgenden Kriterien definiert (nach *Hallek et al. 2008*):

1. Anzeichen eines fortschreitenden Knochenmarkversagens, welches sich durch die Entwicklung bzw. die Verschlimmerung einer Anämie und/oder Thrombozytopenie äußert.
2. Massive (d.h. mindestens 6cm unter dem linken Rippenbogen) oder progrediente oder symptomatische Splenomegalie.
3. Massive (d.h. mindestens 10cm im längsten Durchmesser) oder progrediente oder symptomatische Lymphknotenschwellungen.
4. Progrediente Lymphozytose mit einem Zuwachs von mehr als 50% in einem Zeitraum von 2 Monaten oder eine Lymphozytenverdopplungszeit (LDT) von weniger als 6 Monaten. Die LDT kann durch lineare Regression aus absoluten Lymphozytenzahlen extrapoliert werden, die man über einen Beobachtungszeitraum von 2 bis 3 Monaten alle 2 Wochen bestimmt. Bei Patienten mit anfänglichen Lymphozytenzahlen von weniger als $30x10^9/l$ (30000/µl) sollte die LDT alleine nicht als Therapieindikation gewertet werden. Außerdem sollten weitere Faktoren (z.B. Infektionen), die zur Lymphozytose oder Lymphadenopathie beitragen können, ausgeschlossen werden.
5. Autoimmunhämolytische Anämie und/oder Thrombozytopenie, die kaum auf Kortikosteroide oder andere Standardtherapien anspricht.
6. Konstitutionelle Symptome, definiert als eines oder mehrere der folgenden krankheitsbezogenen Symptome oder Zeichen:
   a) ungewollter Gewichtsverlust von 10% oder mehr innerhalb von 6 Monaten;
   b) Fieber über 100,5°F bzw. 38,0°C über 2 oder mehr Wochen ohne Nachweis einer Infektion;
   c) Nachtschweiß über mehr als 1 Monat ohne Nachweis einer Infektion.

Die Wahl des Therapieregimes orientiert sich maßgeblich an vorhandener Komorbidität und Alter: Während jüngere Patienten oder diejenigen mit ungünstiger Prognose von aggressiveren Therapien unter Einbezug einer frühen, potentiell kurativen allogenen Stammzelltransplantation profitieren können, steht bei älteren oder Niedrigrisikopatienten die Beherrschung der Symptomatik unter Vermeidung von toxischen Nebenwirkungen im Vordergrund.

Die ursprüngliche Standardtherapie mit Alkylanzien, wie z.B. Chlorambucil (Leukeran®) mono, hat keinen Überlebensvorteil erbracht und ist aktuell nur mehr bei älteren Patienten Therapie der Wahl (*Abbott 2006*). Die Entdeckung der Nucleosidanaloga als hochaktive CLL-Therapeutika in Mono- oder auch in Kombinationstherapien, führte zu einer drastischen Erhöhung der Ansprechraten auf bis zu 80% (*O`Brien et al. 2001*).

Relativ neu und vielversprechend ist die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen CD20- (Rituximab) und CD52- (Alemtuzumab) Oberflächenantigene auf den malignen B-Lymphozyten im Rahmen von Chemo-Immuntherapien. Dank dieser neuen Strategien konnte ein Anstieg der Zahl vollständiger Remissionen von 7% auf bis zu 70% verzeichnet werden. Auch in der Behandlung der fludarabinrefraktären CLL gewann Alemtuzumab aufgrund signifikanter Ansprechraten zunehmend an Bedeutung (*Keating et al. 2005*).

Historische Vergleiche deuten darauf hin, dass sich das Gesamtüberleben mit dem Einsatz von Chemo-Immuntherapien verbessert hat (*Abrisqueta et al. 2009*). Dennoch wiesen randomisierte Studien bisher kaum einen Überlebensvorteil für eine bestimmte Kombinationstherapie in der Behandlung der CLL nach (*Catovsky et al. 2007, Eichhorst et al. 2006*). Eine multivariate Analyse in der CLL4-Studie der German CLL Study Group (GCLLSG) legt nahe, dass dies unter Berücksichtigung des Genprofils möglich wäre (*Stilgenbauer et al. 2008, Zenz et al. 2010*). Hieraus begründet sich das Bestreben, prädiktive Marker als Basis eines stratifizierten Therapiekonzepts zu identifizieren, was nicht zuletzt helfen könnte, Niedrigrisikogruppen vor unnötigen, toxischen Therapien zu verschonen (*Zenz, Mertens et al. 2009*).

1.3. Prognostische Faktoren der Chronischen Lymphatischen Leukämie

Die klinische Stadieneinteilung erfolgt wie eingangs erläutert nach den Klassifikationssystemen von Rai und Binet, die das Ausmaß der Lymphadenopathie, Splenomegalie, Anämie und/oder Thrombopenie erfassen. Um in frühen Stadien der Erkrankung zwischen der stabilen „smoldering CLL" mit annähernd normaler Lebenserwartung und der aggressiven „active CLL" zu unterscheiden, werden zusätzliche Parameter herangezogen:

Lymphozytenzahlen >30.000/µl und eine Erhöhung der Lactatdehydrogenase (LDH) als Zeichen hoher Tumorlast, eine Lymphozytenverdopplungszeit (LDT) <12 Monate und eine diffuse Knochenmarkinfiltration sind mit ungünstiger Prognose assoziiert (*Montillo et al. 2005*). Erhöhte Konzentrationen von Thymidinkinase, $ß_2$-Microglobulin oder löslichem CD23 im Serum wurden als Marker für einen aggressiven Verlauf identifiziert (*Hallek et al. 1999; Wierda et al. 2009*).

Auch genetische Marker der Tumorzellen, wie Genomaberrationen (17p13- und 11q23-Deletionen, Trisomie 12) und Genmutationen (TP53, ATM), fließen in die Prognose-Abschätzung ein. TP53-Mutationen und 17p13-Deletionen sind in hohem Maße mit Therapieversagen und extrem schlechter Prognose assoziiert (*elRouby et al. 1993; Döhner et al. 2000*). Dies rechtfertigt nicht nur die Anwendung von Pharmaka, deren Wirkmechanismus unabhängig von intaktem p53 ist (Alemtuzumab, Lenalidomid, Flavopiridol), sondern auch die frühe allogene Stammzelltransplantation (*Dreger et al. 2007*).

Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Mutationsstatus der variablen Region von Immunglobulin-Schwerketten-Genen (IGHV), die in normalen wie auch neoplastischen Lymphozyten den B-Zell-Rezeptor codieren. Die hohe Rezeptorvielfalt wird neben der zufälligen Kombination von V-, D- und J-Segmenten durch den Prozess der somatischen Hypermutation während der Passage des Keimzentrums generiert. CLLs mit mutierten IGHV- Genen entstehen

vermutlich aus Post-Keimzentrums-B-Zellen (*Seifert u. Küppers 2009*) und unterscheiden sich durch geringere Reagibilität und eine deutlich bessere Prognose von jenen mit nicht mutierten IGHV-Genen (*Hamblin et al. 1999, Damle et al. 1999, Kröber et al. 2002*). Ob letztere aus naiven CD5+ B-Zellen vor Durchwanderung des Keimzentrums hervorgehen, ist nicht abschließend geklärt (*Klein et al. 2001*). Die prognostischen Unterschiede zwischen diesen Subgruppen erklären sich aus wichtigen biologischen Eigenschaften, wie dem Expressionsniveau von Zeta-assoziiertem Protein 70 (ZAP70) und CD38, unterschiedlicher Aktivität der zentralen intrazellulären Signaltransduktionswege, sowie variabler genetischer Stabilität der neoplastischen Zellen (*Damle et al. 1999, Kröber et al. 2002, Rosenwald et al. 2001*).

1.4. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

1.4.1. SNPs: Bedeutung der genetischen Variation

99,9 Prozent unseres Erbguts sind bei allen Menschen identisch. Durchschnittlich alle 500 bis 1000 Basenpaare ist jedoch ein bestimmter Baustein unseres Genoms gegen einen anderen ausgetauscht. Diese zufälligen Veränderungen werden von Generation zu Generation vererbt und machen einen großen Teil unserer Unterschiede aus: Insgesamt etwa drei bis sechs Millionen solcher Variationen liegen vermutlich in unserem Erbgut versteckt. Kommt ein solcher Austausch bei mindestens einem Prozent der Bevölkerung – genauer gesagt einer Population, also einer ethnischen Gruppe – vor, spricht man von einem SNP, einem **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism (*Foernzler 2000).*

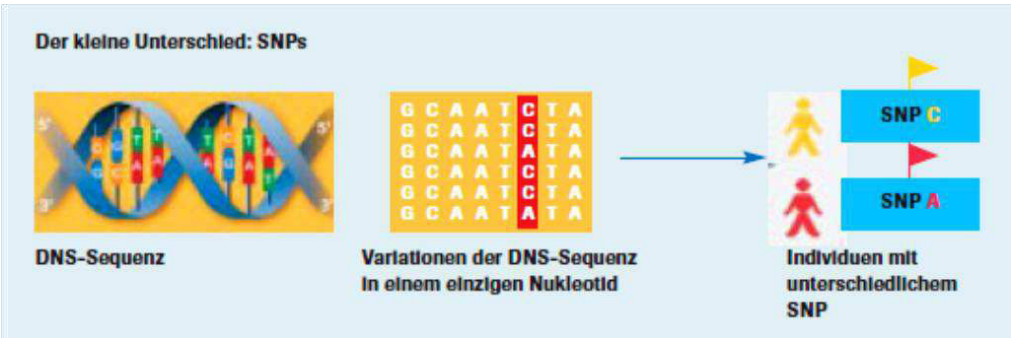

Abbildung 1: Als **Single Nucleotide Polymorphism** bezeichnet man den Austausch eines einzelnen Nukleotids in der DNA-Sequenz des Genoms. Dieser kann zu einem veränderten Phänotyp führen (aus *Foernzler 2000).*

Besonders häufig ist der Austausch der Base Cytosin (*C*), da Cytosin im Wirbeltiergenom häufig methyliert wird und durch spontane Desaminierung von 5-Methyl-Cytosin die Base Thymin (*T*) entsteht.

In Abhängigkeit von der Lokalisation im Erbgut (siehe Abbildung 2) kann ein solcher Basenaustausch sehr unterschiedliche Konsequenzen haben:

- *rSNPs (random SNPs):* Die weitaus meisten SNPs finden sich in den sogenannten stillen Bereichen unseres Genoms, welche ca. 90 Prozent unserer DNA ausmachen. Veränderungen in diesen Regionen haben in der Regel keine Auswirkung auf den Phänotyp eines Menschen.
- *gSNPs (Gen-assoziierte SNPs):* Viele SNPs liegen in unmittelbarer Nähe von Genen bzw. in den Introns. Diese Bereiche werden zwar nicht in ein Genprodukt übersetzt, enthalten jedoch wichtige Kontrollelemente des Gens, die unter Einfluss von *gSNPs* das Ablesen eines Gens behindern oder beschleunigen können.
- *cSNPs (codierende SNPs):* SNPs im Bereich von Exons haben oft einen großen Einfluss auf die Funktion des entsprechenden Genprodukts.
- *pSNPs (Phänotyp-relevante SNPs):* Sowohl *gSNPs* als auch *cSNPs* können den Phänotyp eines Menschen beeinflussen – erstere über die Menge, letztere über die Funktion des entsprechenden Genproduktes.

Für die Medizin sind die *pSNPs* die entscheidenden Variationen. Ihre Auswirkungen lassen sich grob in zwei Bereiche unterteilen: Die Beteiligung an der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten einerseits und andererseits das Eingreifen in die Therapie, genauer gesagt in den Umgang unseres Körpers mit Medikamenten. .

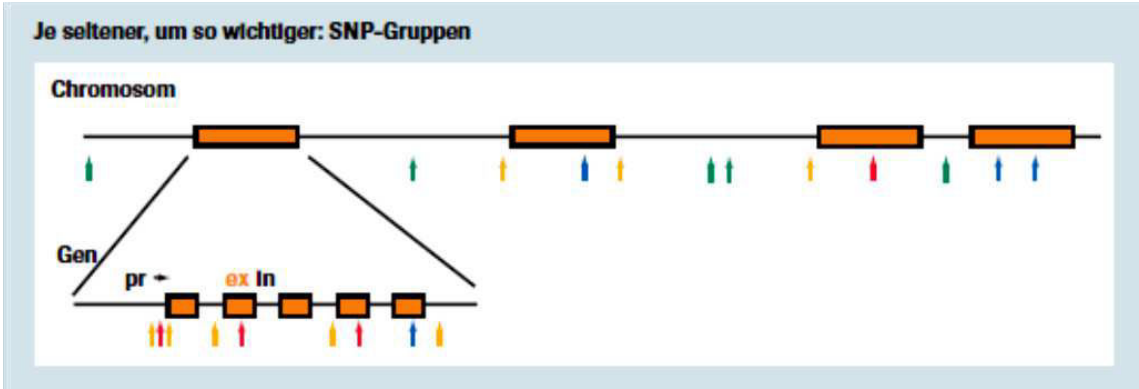

Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher **Lokalisationen von SNPs** (**S**ingle **N**ucleotide **P**olimorphisms) im menschlichen Genom**.** *Grüne Pfeile,* r(andom)SNPs; *gelbe Pfeile,* g(en-assoziierte)SNPs; *blaue Pfeile,* c(odierende)SNPs; *rote Pfeile,* p(hänotyp-relevante)SNPs; *Pr*, Promoter; *ex*, Exon; *in*, Intron (aus *Foernzler 2000).*

Theoretisch kann ein einziger SNP für die Entstehung und den Verlauf einer Krankheit verantwortlich sein. Den weitaus meisten Erkrankungen liegt jedoch eine multifaktorielle Genese zugrunde, d.h. ein komplexes Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren. Wenn ein bestimmter SNP immer zusammen mit einer Störung beobachtet wird, liegt der Schluss nahe, dass er an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, also eine Grundlage für eine Krankheitsveranlagung bildet. Dennoch lässt sich aus dem Vorliegen eines prädisponierenden SNP nicht automatisch eine Krankheitsentstehung ableiten, da ein SNP-Träger gesund bleiben und andererseits eine Person, die den entsprechenden SNP nicht trägt, erkranken kann – eine Tatsache, die genetische Screenings äußerst kompliziert macht.

In den vergangenen Jahren rückte die Rolle verschiedener SNPs in der Pathogenese von Krebserkrankungen zunehmend ins Visier der Forscher. Auch für die CLL wurde ein Einfluss bestimmter SNPs, wie der hier untersuchten *MDM2*-Promotor- und *BCL2-938C>A*-Polymorphismen, postuliert.

1.4.2. Der *MDM2*- Promotor Polymorphismus

MDM2 (murine double minute 2) ist ein wichtiger Regulator des Proteins p53, ein Schlüsselenzym der Zellzyklusregulation, des Zellwachstums und der Tumorsuppression.

Das TP53-Gen ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und wird durch diverse Stressoren, wie UV-Licht oder Doppelstrangbrüche in der zellulären DNA aktiviert. Die p53-Signalkaskade mündet in einen Zellzyklusarrest und ermöglicht es DNA-Reparatursystemen, aktiv zu werden. Ist der Schaden irreparabel, so induziert p53 die Expression pro-apoptotischer Proteine. Durch Hemmung tumorinduzierter Gefäßproliferation vermag p53 außerdem, das Wachstum maligner Neoplasien einzudämmen (*elDeiry 1998; Hendrix 2000*).

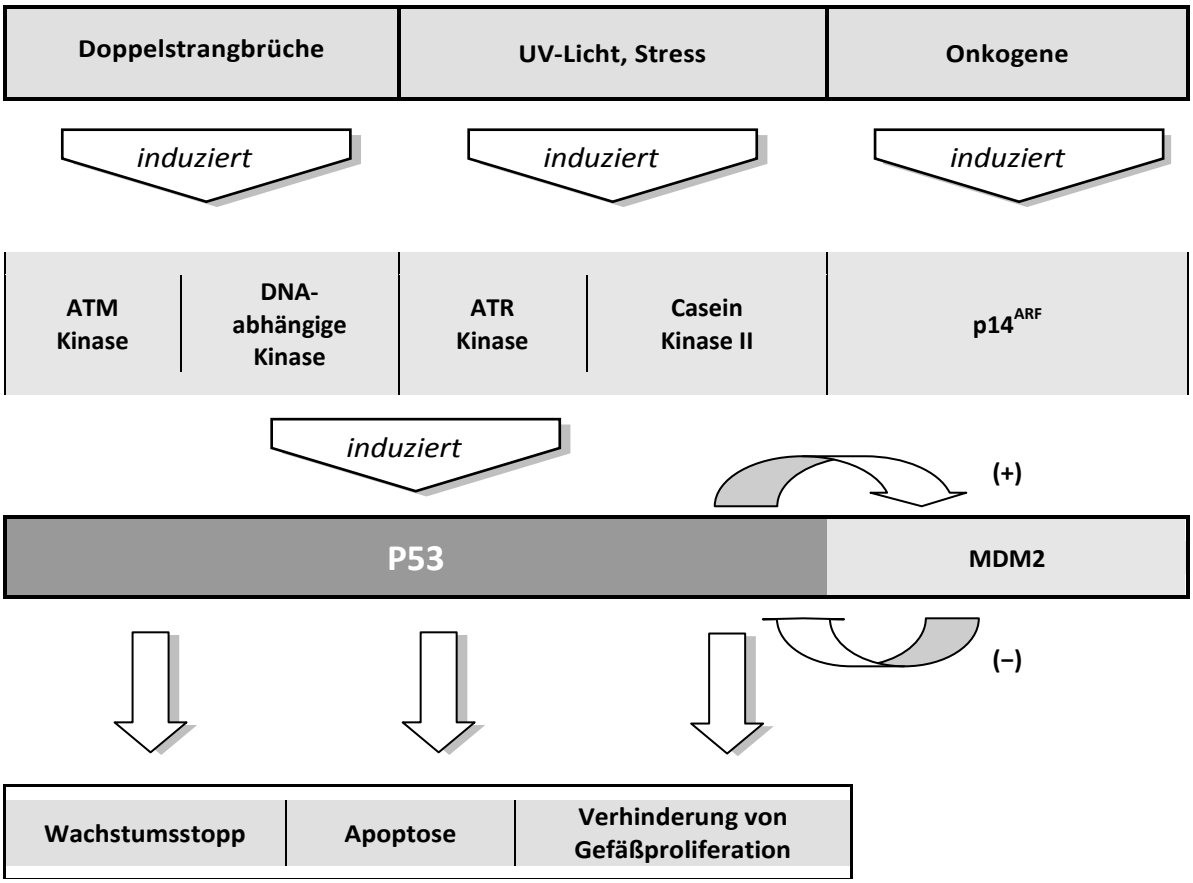

Abbildung 3: Das p53-Netzwerk. Zellstress (in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen, UV-Strahlung oder Onkogeneinfluss) stimuliert Enzyme, welche die Aktivität von p53 und seines negativen Regulators *MDM2* modifizieren. Daraus resultieren erhöhte Spiegel an aktivem p53-Protein, welches über Bindung an regulatorische DNA-Sequenzen die Expression seiner Zielgene induziert. Diese Zielgene sind an Prozessen beteiligt, welche die Tumorentwicklung bremsen. Einige hemmen beispielsweise den Zellzyklus oder die Gefäßproliferation zur Versorgung des wachsenden Tumors; andere fördern die Apoptose. Ein **negativer Feedbackmechanismus zwischen *MDM2* und p53** hemmt diese Prozesse. Eine Reihe weiterer Bestandteile dieses genetischen Netzwerkes, die hier nicht gezeigt werden, sind identifiziert worden. So führt die Aktivierung von p53 u.a. auch zum Erhalt der genetischen Stabilität, der Zelldifferenzierung sowie der Produktion extrazellulärer Matrix, zytoskelettaler Komponenten und sezernierter Proteine. Die Bestandteile dieses Regulationsnetzwerkes sowie deren Aktivitätsniveau variieren in Abhängigkeit des Zelltyps. p53 ist ein zentraler Knotenpunkt in diesem Netzwerk und es verwundert daher nicht, dass bei nahezu allen menschlichen Krebsleiden ein Verlust der p53-Funktion vorliegt.
ATM, **A**taxia **T**eleangiectasia **M**utated; *ATR,* **A**taxia **T**elengiectasia **R**elated; (modifiziert nach *Vogelstein et al. 2000*).

Hohe Konzentrationen von p53 binden am p53-response element in der Promotorregion des *MDM2*-Gens auf Chromosom 12q14.3-q15 und steigern dadurch dessen Transkriptionsrate. Der Promotor liegt als regulatorische Nucleotidsequenz am 5`-Ende des Gens und enthält zahlreiche Bindungsstellen

(sog. response elements) zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Letztere können die Genexpression entweder fördern oder hemmen und werden dementsprechend als *Enhancer* oder *Silencer* bezeichnet.

Das im *MDM2*-Gen (***H****UGO* ***G****ene* ***N****omenclature* ***C****ommittee ID: 6973*) codierte Phosphoprotein ist eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase, die p53 für den Abbau im Proteasom markiert. Über diesen negativen Feedbackmechanismus wird die p53-Konzentration in der Zelle auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten (siehe Abbildung 3). Eine Störung dieses empfindlichen biologischen Gleichgewichts kann zu ungehemmtem Zellwachstum und in der Folge zur Tumorentstehung führen.

Vor einigen Jahren wurde ein SNP in der *MDM2*-Promotorregion (IVS1+309) entdeckt, der über eine veränderte *MDM2*-Transkription direkt den p53-Signalweg beeinflusst (siehe Abbildung 4): Es handelt sich dabei um den Austausch einer Thymin(T)- gegen eine Guanidin(G)-Base im Nukleotid 309 des Introns 1 nahe dem p53 response element. Dieser Basenaustausch erhöht die Affinität einer DNA-Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1, was eine Zunahme von *MDM2*-RNA und -Protein nach sich zieht. Besonders hohe *MDM2*-Level finden sich in Zelllinien, die homozygot für das G-Allel sind. Es konnte gezeigt werden, dass bei dieser Genkonstellation eine gestörte p53-Antwort mit schwacher Apoptose-Induktion resultiert (*Bond et al. 2004*).

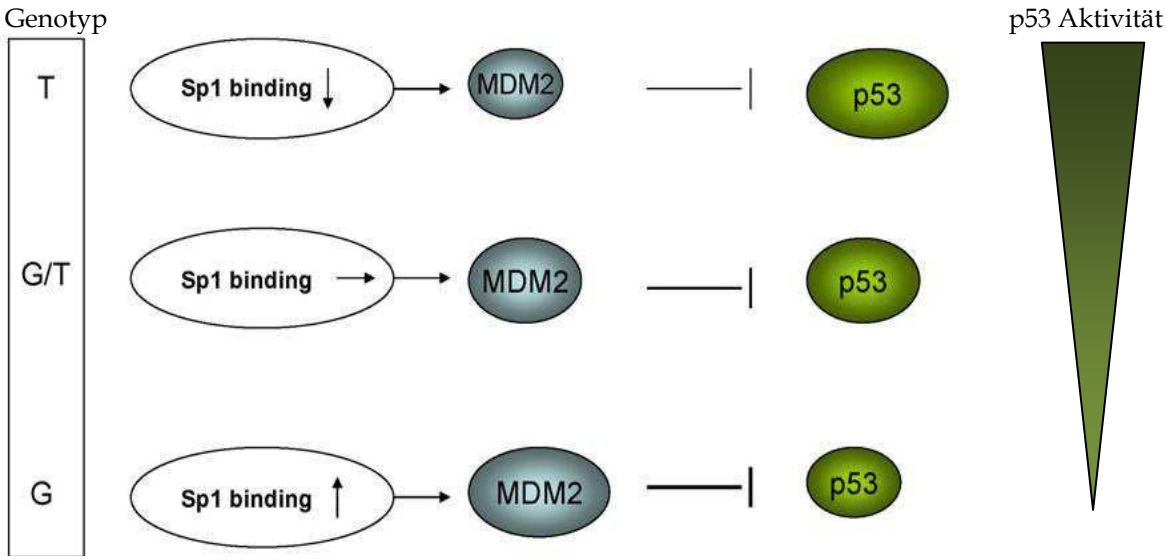

Abbildung 4: Modell für den Einfluss des *MDM2*-SNP309 auf das *MDM2*/p53-Level. Der Austausch einer Thymin(*T*)- gegen eine Guanidin(*G*)-Base im Nukleotid 309 der *MDM2*-Promotorregion erhöht die Affinität einer DNA-Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Dieser steigert die Expression des *MDM2*-Gens und die steigenden *MDM2*-Spiegel reprimieren die Aktivität des Tumorsuppressors p53.
Sp1, Transkriptionsfaktor; ↓ geringere Affinität; → gleichbleibende Affinität; ↑ erhöhte Affinität (modifiziert nach *Bond u. Levine 2007*).

Die Rolle des *MDM2*-SNP309 in der Tumorentstehung weckte zunehmendes Interesse, als bekannt wurde, dass der *GG*-Polymorphismus die Karzinogenese bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom um 10-12 Jahre beschleunigt (*Bond et al. 2004*). Eine Reihe weiterer Krebsformen wurden daraufhin auf einen Zusammenhang mit dem *MDM2*-Promotor-SNP untersucht, was zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen führte: So konnte eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse zwar keinen Einfluss des Polymorphismus auf das kolorektale Karzinom oder das Brustkarzinom nachweisen, wohl aber eine geringfügige Prädisposition für das Bronchialkarzinom (*OR=1,27; 95%CI=1,12-1,44*). In Einklang mit den oben beschriebenen Auswirkungen des *MDM2*-SNP309, spielt dieser nach bisherigen Erkenntnissen eher eine Rolle in der Krankheitsentstehung als für Verlauf und Prognose (*Wilkening et al. 2007*).

In Anbetracht der wichtigen Rolle von p53 für die Prognose der CLL (siehe Kapitel 3.1.) einerseits und der außerordentlich genauen Kenntnisse über die

funktionellen Auswirkungen des *MDM2*-SNP309 andererseits, ist es naheliegend, eine mögliche Assoziation zu untersuchen. Wie weiter oben bereits erwähnt, zählt außerdem die Trisomie 12q zu den Prognosefaktoren der CLL und da sich der *MDM2*-Locus auf diesem Chromosom befindet, wäre ein Gendosis-bedingter Effekt durchaus vorstellbar (*Zenz et al. 2010*).

1.4.3. Der *BCL2 -938C>A* Polymorphismus

Das B-cell lymphoma 2 (*BCL2*)-Gen ist auf Chromosom 18q21.3 lokalisiert und codiert das *BCL2*-Protein, welches als Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie (siehe Abbildung 5) maßgeblich an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt ist. Einige Mitglieder dieser Familie fördern die Apoptose (*BAX, BAD*, *BAK* u.a.), während andere sie verhindern (*BCL2*, *BCL-XL*). Das Gleichgewicht beider Parteien spielt eine Schlüsselrolle in der Zellhomöostase und der Krebsentstehung (*Loro et al. 1999, Chen et al. 2007*).

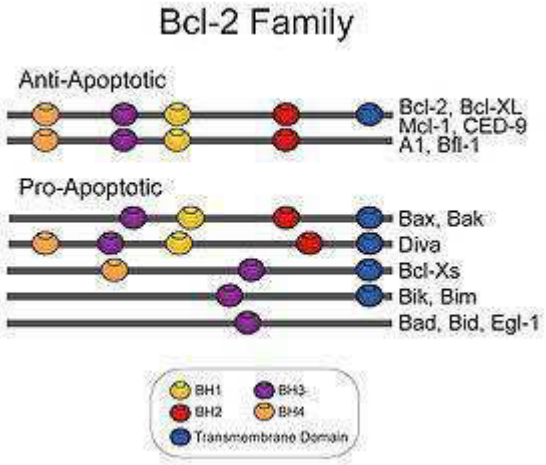

Abbildung 5: Mitglieder der *BCL2*-Proteinfamilie regulieren den programmierten Zelltod (*Chao und Korsmeyer 1998*).

Ein Defizit in der Apoptose-Induktion, z.B. infolge Überexpression des anti-apoptotischen *BCL2*, ist eine Art „Lebensversicherung" für neoplastische Zellen und fördert die Tumorprogression. Erwartungsgemäß ist eine gesteigerte *BCL2*-

Expression beim Prostatakarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert (*Keshgegian et al. 1998*) — eine Beobachtung, die jedoch nicht für das kolorektale Karzinom oder Mammakarzinom zutrifft (*Ofner et al. 1995, Zhang et al. 1998*).

Neben drei Exons enthält das *BCL2*-Gen noch zwei Promotorsequenzen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften (siehe Abbildung 6). Der zweite Promotor (P2) ist ein negatives Regulationselement, er hemmt die Aktivität des ersten Promotors (*Young u. Korsmeyer 1993*). In der inhibitorischen P2-Promotorregion ist ein funktioneller Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP *-938C>A*) bekannt, der durch Austausch einer Cytosin(*C*)- durch eine Adenosin(*A*)-Base in Position -938 entsteht.

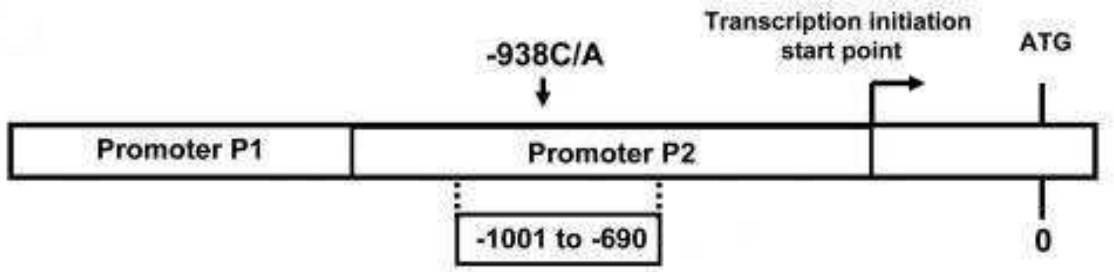

Abbildung 6: Aufbau der *BCL2*-Promotorregion. Gezeigt sind der aktivierende P1-Promotor und der inhibierende P2-Promotor, sowie die Lokalisation des *-938C>A*-Polymorphismus. *ATG* ist das Startcodon für die Translation; der Pfeil markiert den Startpunkt für die Transkription (modifiziert nach *Nückel et al. 2007*)

In Western-Blot und immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine erhöhte *BCL2*-Expression in Brustkrebszellen mit dem A-Allel gefunden, was sich bei dieser Tumorentität als prognostisch günstig erwies (*Lehnert et al. 2009*).

Chen et al. (2007) untersuchten die Rolle von *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus als Risikofaktor für ein Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals in einer großen Stichprobe von Kaukasiern. Dabei ergab die Risikoevaluation der Gesamtpopulation keine signifikanten Ergebnisse. In der Subgruppenanalyse war der Genotyp *-938CC* jedoch mit einem deutlich erhöhten Tumorrisiko assoziiert.

In Studien zum Prostatakarzinom stellte die *BCL2-938CC*-Konstellation einen unabhängigen Risikofaktor für ein Rezidiv nach radikaler Prostatektomie dar (*Keshgegian et al. 1998; Hirata et al. 2009*).

Zur prognostischen Bedeutung für die CLL präsentierten *Nückel et al. (2007)* die Ergebnisse einer Kohortenstudie mit 123 Patienten, die den Einfluss des *BCL2*-Promotor-SNP (*-938C>A*) auf die Endpunkte time to first treatment (TFT) und overall survival (OS) untersuchte. Patienten, die das C-Allel trugen, waren jenen mit der homozygoten *AA*-Variante im Hinblick auf beide Endpunkte überlegen, was die Autoren als Folge einer Allel-spezifisch gesteigerten *BCL2*-Expression interpretierten.

Neuere Studien konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen: In drei unabhängigen CLL-Kohorten, die jeweils zwischen 182 und 276 Probanden umfassten, konnte der SNP (*-938C>A*) weder mit einer erhöhten *BCL2*-Expression noch mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (*Kaderi, Norberg et al. 2008, Majid et al. 2008, Rossi et al. 2008*).

1.5. Intention der Arbeit

In den vergangenen Jahren hat unsere Vorstellung von der Pathogenese der CLL erheblich an Präzision gewonnen. Die Erkenntnis, dass genetische Faktoren von prognostischer Bedeutung sind, prägt die aktuelle Forschungsstrategie, die mittels der Entwicklung prognostischer Modelle das Ideal einer Genotyp- oder Risikofaktoren-adaptierten Therapie anstrebt (*Zenz, Mertens et al. 2009*).

Gerade bei der Analysierung von SNPs zeigt die Erfahrung jedoch, dass es meist nicht gelingt, anfänglich beobachtete Assoziationen in unabhängigen Datensätzen zu verifizieren. Die Hypothesen basieren oft auf relativ klein angelegten Studien ohne Einschluss von Vergleichsgruppen und Bestätigung durch größere Folgestudien. Es gilt daher, neben der wissenschaftlichen Erklärung, warum und wie bestimmte SNPs den Verlauf der CLL beeinflussen könnten, einige statistische Aspekte zu beachten, die bei der Planung und Bewertung zukünftiger Studien helfen können: Da der messbare Effekt eines SNP vermutlich recht subtil ausfällt, werden große Studien benötigt. Dies wird nachvollziehbar, wenn man sich vor Augen führt, dass die Power eines statistischen Tests sowohl mit wachsender Fallzahl als auch mit zunehmender Größe des zu zeigenden Unterschieds (ausgedrückt als Hazard Ratio, *HR*) wächst (siehe Abbildung 7). Gängige Kohortengrößen von 100 bis 200 Probanden eignen sich daher nur zum Nachweis von Einflüssen, die sich zumindest in einer Hazard ratio (*HR*) >2 niederschlagen. Die geringen Veränderungen infolge von SNPs mit einer *HR* unter 1,4 können nur mittels großer Kohorten (>500 Patienten) erkannt werden (*Zenz et al. 2010*).

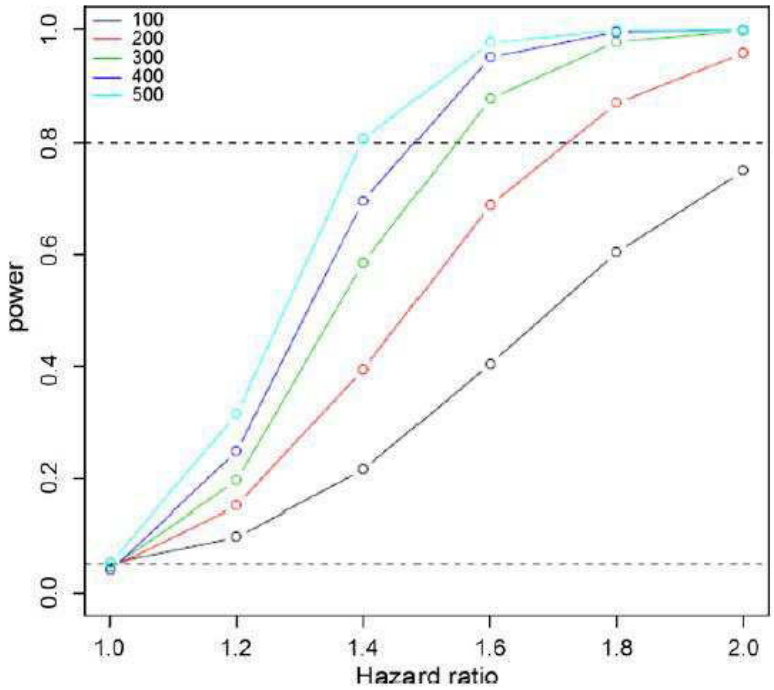

Abbildung 7: Die statistische Power einer Studie als Funktion der Hazard Ratio und variabler Fallzahlen (farbkodiert). Für den Nachweis kleiner Unterschiede (ausgedrückt als niedrige Hazard Ratio) sind große Fallzahlen (blaue Kurve) nötig, um eine ausreichende Power zu erreichen. Die gestrichelten Linien markieren das 5%-Signifikanzniveau und eine Power von 80%, wie sie häufig der Fallzahlberechnung in Studien zugrundegelegt werden (aus *Zenz et al. 2010*).

Aus diesen Notwendigkeiten erwuchs der Gedanke an die Entwicklung einer CLL-Datenbank, die durch detaillierte klinische und genetische Befunde sowie möglichst lückenloses follow-up ein umfangreiches Reservoir für die Verifizierung von CLL-Studienergebnissen bietet. Im Folgenden soll die Verwirklichung dieses Projekts beleuchtet sowie dessen Nutzen am Beispiel der eingangs erläuterten SNPs dargestellt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Aufbau und Inhalte der klinischen Datenbank

2.1.1. Konzept der klinischen Datenbank

Die Korrelation von Genotyp und Phänotyp bedarf neben sorgfältiger Arbeit im Labor einer genauen Dokumentation klinischer und laborchemischer Parameter, um die Bedeutung gefundener genetischer Charakteristika für den Krankheitsverlauf bewerten zu können. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Systems „*Access 2000*“ von Microsoft eine Datenbank entwickelt, die alle zwischen 1999 und 2009 am Universitätsklinikum Ulm (mit)behandelten CLL-Patienten (*n=485*) sehr detailliert erfassen soll. Auf Basis dieses umfangreichen Datensatzes wird es möglich sein, Hypothesen auf ihre Gültigkeit zu überprüfen und den prognostischen Einfluss neuer Marker zu bemessen.

2.1.2. Datenquellen

Das Patientenkollektiv setzt sich aus hausintern diagnostizierten und von extern zur Therapie in Ulm vorgestellten CLL-Patienten zusammen, von denen im Zeitraum zwischen 1999 und der Öffnung der Datenbank im Mai 2009 Tumormaterial zur Untersuchung eingesandt wurde. Sämtliche Materialeingänge dieser 485 Patienten sind in einer Datenbank unter einer Codenummer dokumentiert und von der Datenbank aus abrufbar.

Als Quelle für die Dateneingabe dienen vorrangig die hausinternen elektronischen Datenspeichersysteme SAP (**S**ystem**a**nalyse und **P**rogrammentwicklung) und PMS (**P**roduktions Management **S**ystem). Beide enthalten interne und externe Arztbriefe, eingescannte Anamnesebögen sowie Befunde aus Labor und Radiologie. Nicht gescannte Dokumente können in archivierten Akten eingesehen

werden. Zusätzlich wurde telefonischer Kontakt mit Haus- und Fachärzten aufgenommen.

Bei der Dateneingabe gilt der Grundsatz, dass jede eingetragene Information aus verlässlicher Quelle (i.e. Originalbefunde, Arztbriefe o.ä.) stammen und anhand definierter Kriterien (z.B. Remissionskriterien nach *Hallek et al. 2008*) überprüft werden muss. Bleibt die Recherche im Bezug auf eine Variable dennoch erfolglos, so ist die Ausprägung mit „not known"(*n.k.*) zu bewerten.

2.1.3. Definition von Variablen

Die Auswahl der zu erfassenden Variablen erfolgte aufgrund ihrer Bedeutung für Prädisposition, Stadien-Einteilung, Prognose und Therapieverlauf der CLL. Es wurde Wert darauf gelegt, dass weit verbreitete, anerkannte Klassifikationssysteme [z.B. Rai-, Binet-Klassifikation (siehe Tabellen 2 und 3), Remissionskriterien nach *Hallek et al. 2008* (siehe Tabelle 8)] zur Anwendung kommen, um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studienpopulationen zu gewährleisten.

Jede Variable wurde mit einer eindeutigen Definition hinterlegt, um abweichenden Auslegungen bei der Bearbeitung durch verschiedene Personen vorzubeugen (siehe Tabellen 5 und 6).

Tabelle 5: Überblick über die **Definitionen der Basisvariablen,** anhand derer die 485 CLL-Patienten in unserer klinischen Datenbank in Ulm erfasst werden.

VARIABLE	AUSPRÄGUNG	DEFINITION
Erstdiagnose (ED)	*Datum*	anhand Durchflusszytometrie-, oder KM-Befund; alternativ Blutbild; wenn nur Monat u. Jahr bekannt: Median des Monats (15.XX.XXXX); wenn nur Jahr bekannt: Median des Jahres (1.7.XXXX);
CLL-spezifische Therapie	JA NEIN n.k.	JA: nur wenn Patient die Therapie aufgrund der CLL erhalten hat;
SZT	AUTOLOG ALLOGEN AUTO + ALLO NEIN	NEIN, wenn keine durchgeführt, ansonsten Transplantationsart angeben;

Datum der SZT	*Datum*	Exaktes Transplantationsdatum; (nicht Start der Konditionierungstherapie)
Raucher	JA NEIN	Hat der Patient jemals in seinem Leben geraucht?
Packyears	*Zahl* n.k.	Berechnung nach Formel: [(Anzahl der Zigaretten pro Tag/20)× gerauchte Jahre]
Beruflicher Status	*Auswahl*	Früherer Beruf des Patienten auch wenn dieser bei ED bzw. im Verlauf berentet
Berufsbeschreibung	*Freitext*	Konkrete Beschreibung unter Berücksichtigung beruflicher Risikofaktoren; ggfs. Erwähnung, falls Patient berentet
Vorerkrankungen	*Freitext*	Erfassung aller Vorerkrankungen von ED bis zum letzten Kontakt („last known alive"), Ausnahme: Malignome und hämatologische Erkrankungen → extra erfasst
Hochmaligne Transformation	*Datum* NEIN n.k.	Histo-/zytologische Bestätigung einer hochmalignen Transformation (Richtertransformation etc.)
Last known alive	*Datum*	Letzter Kontakt zum Patienten (umfasst: Vorstellung im Uniklinikum oder extern z.B. beim HA (Brief oder telefonisch belegt), Materialeingang, Sterbedatum
Verstorben?	JA NEIN n.k.	Informationen aus internem, externem Brief oder vom HA
Todesursache	CLL, INFEKTION CLL, THERAPIE-BEZOGEN ANDERE n.k.	Konkrete Todesursache aus Akte/Pflegebericht
Todesursache	*Freitext*	Beschreibung der Todesursache
FAMILIENANAMNESE		
- <u>Patient</u>:		
Malignom	JA/NEIN/n.k. + *Freitext*	*Beschreibung* mit ED;
Lymphom/Leukämie	JA/NEIN/n.k. + *Freitext*	Hämatologische Erkrankungen neben der CLL;
- <u>Mutter/Vater</u>:		
Malignom	JA/NEIN/n.k. + *Freitext*	*Beschreibung* der Erkrankung;
Lymphom/Leukämie	JA/NEIN/n.k. + *Freitext*	wenn keine Nennung familiärer
Andere Erkrankung	JA/NEIN/n.k. + *Freitext*	Neoplasien in Anamnese, dann NEIN
- <u>Geschwister/Kinder</u>:		
Anzahl	*Zahlenwert*	
Rest analog		

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *ED,* **E**rst**di**agnose; *KM,* **K**nochen**m**ark; *n.k.,* **n**ot **k**nown; *SZT,* **S**tamm**z**ell**t**ransplantation; *HA,* **H**aus**a**rzt.

Die Bestimmung des Krankheitsstadiums zum Zeitpunkt der dokumentierten Untersuchung erfolgt entsprechend den Klassifikationen von *Rai et al.* und *Binet et al*. nach körperlichem Untersuchungsbefund und Blutbild (siehe Tabellen 2 und 3). Der Allgemeinzustand des Patienten wird mit dem ECOG- (*Oken et al. 1982*) bzw. dem *Karnovsky*-Index (*1949*) gemessen.

Tabelle 6: Dokumentation des Untersuchungszeitpunktes. Bei der Erfassung der 485 CLL-Patienten in der klinischen Datenbank in Ulm ermöglichen die hier definierten Variablen die Charakterisierung der Symptomatik zum Zeitpunkt des Materialeingangs.

VARIABLE	AUSPRÄGUNG	DEFINITION
Datum der Untersuchung	*Datum*	Primär ED-Datum, wenn zu ED kein Materialeingang → Datum des ersten Materialeingangs
Untersuchungszeitpunkt	ERSTDIAGNOSE VERLAUF ED/ZWEITSTUDIE VERLAUF/ZWEITSTUDIE	Zeitliche Einordnung der erhobenen Daten zu Klinik, Labor, Genetik etc.
Binet	*A* *B* *C* n.k.	Klassifikation nach BB und körperlicher Untersuchung (siehe Tabelle 3)
Rai	*I* *II* *III* *IV* n.k.	Klassifikation nach BB und körperlicher Untersuchung (siehe Tabelle 2)
CLL-Status	NO THERAPY COMPLETE REMISSION PARTIAL REMISSION STABLE DISEASE PROGRESSIVE DISEASE n.k.	Verwendung der Remissionskriterien nach *Hallek et al. (2008)*
B-Symptome	JA NEIN n.k.	Fieber >38°C über >2 Wochen, Nachtschweiß mit Wäschewechsel über 1 Monat, Gewichtsverlust (>10%/6 Monate); auch bei nur gelegentlichem Auftreten eines Symptoms → JA ;
Karnofsky	0–100% n.k.	aus Brief, ggfs. aus Klinik und Anamnese erschließen;
ECOG (*Oken et al. 1982*)	0, 1, 2, 3, 4, 5 n.k.	Umrechnung aus Karnofsky-Index (*Karnovsky et al. 1949*)
LDT (Lymphozyten-verdopplungszeit)	*Datum, Leukozytenzahl, Lymphozytenanteil*	4 Blutbilder im Abstand von je ca. 6 Monaten als Berechnungsgrundlage;
<u>Klinische Untersuchung</u> Extranodalbefall: - Datum - Lokalisation	 JA/NEIN *Datum* LUNGE LEBER etc. n.k.	 Datum mit histologischer Sicherung

Lymphadenopathie: - cervikal/submand./ infra- und supra-claviculär /occipital - axillär - inguinal - andere	*max. Größe in [cm×cm]*	Tastbefund aus körperlicher Untersuchung, wenn möglich zweidimensionale Angabe
Lebergröße Milzgröße	*[cm] unter RB* *[cm] unter RB*	Tastbefund unter Rippenbogen; Tastbefund unter Rippenbogen;
<u>Radiologische Untersuchung</u> Datum **Sono/CT/Röntgen** - LK-Lokalisation - Lebergröße - Milzgröße	*Datum* *max. Größe in [cm×cm]* *[cm] in MCL* *Größe in [cm×cm]*	entsprechenden Bildgebungsmodus markieren u. mit Datum versehen; Durchmesser >1cm gilt als pathologische Vergrößerung
CIRS (**c**umulative **i**llness **r**ating **s**cale)	*Freitext+Punktwert*	Eingabe aller Vorerkrankungen entsprechend dem Untersuchungszeitpunkt, keine Eingabe später gestellter Diagnosen; Bewertung nach **Punktesystem**: **0**=keine Beschwerden, keine Therapie notwendig; **1**=u.U. Therapie, gute Prognose; **2**=Therapie notwendig, eingeschränkte Prognose; **3**=Therapie dringend, Prognose unklar; **4**=Lebensbedrohung/Notfall

ED, **E**rst**d**iagnose; *BB,* **B**lut**b**ild; *RB,* **R**ippen**b**ogen; *LK,* **L**ymph**k**noten; *MCL,* **M**edio**c**lavikular**l**inie; *n.k.,* **n**ot **k**nown.

Aus dem Verlauf der Lymphozytenzahlen in vier Differentialblutbildern im Abstand von je sechs Monaten wird die Lymphozytenverdopplungszeit (LDT) berechnet. An serologischen Parametern werden primär solche erfasst, die von prognostischer Bedeutung sind (z.B. LDH, Thymidinkinase, ß$_2$-Microglobulin) (siehe auch Kapitel 1.3.). Der Nachweis monoklonaler Antikörper bzw. Leichtketten in der Immunfixationselektrophorese wird ebenso dokumentiert wie das Ergebnis des direkten und indirekten Coombs–Tests. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die zum Untersuchungszeitpunkt erfassten Laborparameter.

Tabelle 7: Laborparameter. Neben den Ergebnissen der klinischen Untersuchung und Bildgebung werden folgende Laborparameter der CLL-Patienten in der Ulmer Datenbank gespeichert:

Klinische Chemie	Differentialblutbild
LDH	Leukozyten
AST/ALT	Hämoglobin
AP	Thrombozyten
Bilirubin gesamt	Granulozyten
Kreatinin	Lymphozyten
Harnstoff	Prolymphozyten
Haptoglobin	
CRP	
Albumin	
IgG/IgM/IgA	
M-Gradient	
Paraprotein	
Immunfixationselektrophorese (in Serum und Urin)	
ß$_2$-Microglobulin	
Thymidinkinase	
Coombs-Test (direkt/indirekt)	

LDH, **L**actat**deh**ydrogenase*; AST,* **As**partat-Amino**t**ransferase*, ALT,* **Al**anin-Amino**t**ransferase*; AP,* **A**lkalische **P**hosphatase*; CRP,* **C-r**eaktives **P**rotein*; Ig*, **I**mmun**g**lobulin.

2.1.4. Durchflusszytometrie

Als führendes Diagnosekriterium der CLL (siehe Tabelle 1), kommt der Durchflusszytometrie (Syn.: FACS=fluorescence activated cell sorting), einem Verfahren zur Zählung und Differenzierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenstruktur (*Nebe-von-Caron et al. 2000*), besondere Bedeutung zu.

Die im Durchflusszytometer gewonnenen Daten werden im Befund entsprechend Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Für die Dokumentation in unserer klinischen Datenbank haben wir aus den jeweiligen FACS-Befunden die relative Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Oberflächenmarker (CD=Cluster of Differentiation) berechnet. Dazu ist der prozentuale Anteil der Lymphozyten an allen weißen Blutkörperchen („**z%**“ in Abbildung 8) auf dem Befundbogen angegeben. Auf diesen Wert beziehen sich wiederum die Prozentangaben in den einzelnen Fenstern des

Auswertungsdiagramms. Dieser Wert wird als Prozentzahl in der Datenbank gespeichert.

Lymphozyten-Anteil: **z**%

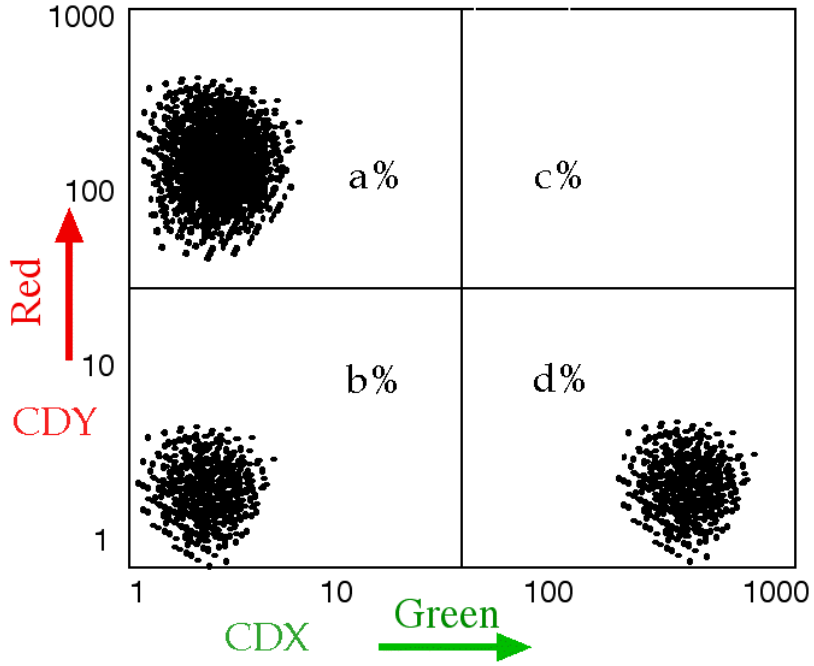

Abbildung 8: Modell für den Auswertungsbogen einer FACS-Analyse. Die schwarzen Punkte repräsentieren einzelne Zellen und die relative Dichte der Punkte pro Quadrant vermittelt einen Eindruck über die relative Häufigkeit der verschiedenen Zelltypen. In unserem Fall repräsentieren die Farben Rot und Grün charakteristische Oberflächenantigene der neoplastischen Lymphozyten (CD5+, CD19+, etc.).

2.1.5. Therapieverlauf

Hat der Patient im Verlauf seiner Erkrankung CLL-spezifische Therapien erhalten, so werden diese in chronologischer Reihenfolge und Datierung angegeben. Aus Untersuchungsbefunden wird die jeweilige Therapieindikation ermittelt (siehe auch Tabelle 4). Im Rahmen von Studien werden auch Therapien ohne klassische Indikation durchgeführt. Für jede Therapie wird gemäß den NCI-Kriterien nach *Hallek et al. 2008* (siehe Tabelle 8) das maximale Ansprechen bewertet und ggfs. das Rezidivdatum ermittelt.

Tabelle 8: Remissionskriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens der CLL (aus *Hallek et al. 2008*).

Parameter	CR*	PR*	PD*
Group A			
Lymphadenopathy†	None > 1.5 cm	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Hepatomegaly	None	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Splenomegaly	None	Decrease ≥ 50%	Increase ≥ 50%
Blood lymphocytes	< 4000/μL	Decrease ≥ 50% from baseline	Increase ≥ 50% over baseline
Marrow‡	Normocellular, < 30% lymphocytes, no B-lymphoid nodules. Hypocellular marrow defines CRi (5.1.6).	50% reduction in marrow infiltrate, or B-lymphoid nodules	
Group B			
Platelet count	> 100 000/μL	> 100 000/μL or increase ≥ 50% over baseline	Decrease of ≥ 50% from baseline secondary to CLL
Hemoglobin	> 11.0 g/dL	> 11 g/dL or increase ≥ 50% over baseline	Decrease of > 2 g/dL from baseline secondary to CLL
Neutrophils‡	> 1500/μL	> 1500/μL or > 50% improvement over baseline	

†Summe aller Lymphknotenvergrößerungen (Beurteilung anhand von CT-Bildern im Rahmen von Studien, ansonsten routinemäßig durch Tastbefund).
‡Diese Parameter sind für einige Ansprech-Kategorien irrelevant.
CR (complete remission): alle Kriterien müssen erfüllt und der Patient frei von krankheitsbezogenen Beschwerden sein;
CRi: CR mit inkompletter Knochenmarkregeneration;
PR (partial remission): mindestens zwei Kriterien der Gruppe A und ein Kriterium der Gruppe B müssen erfüllt sein;
SD (stable disease): erfüllt weder die Kriterien für PR noch für PD
PD (progressive disease): wenigstens eines der oben genannten Kriterien der Gruppe A oder auch B muss erfüllt sein;

2.1.6. Layout der Datenbank

Eine in „*Access 2000*“erstellte Maske dient als Gerüst für die Datensammlung. Die Menüleiste bietet Zugriff auf drei wesentliche Karteikarten: Beim Öffnen eines Patientenfalles erscheint zunächst die Basisseite (siehe Abbildung 9), welche die weiter oben erläuterten Basisvariablen (siehe Tabelle 5) abfragt. Über die Registerkarten „Untersuchungszeitpunkt“ und „Therapie“ lassen sich alternativ die beiden weiteren Karteikarten (siehe Abbildungen 10 und 11) öffnen.

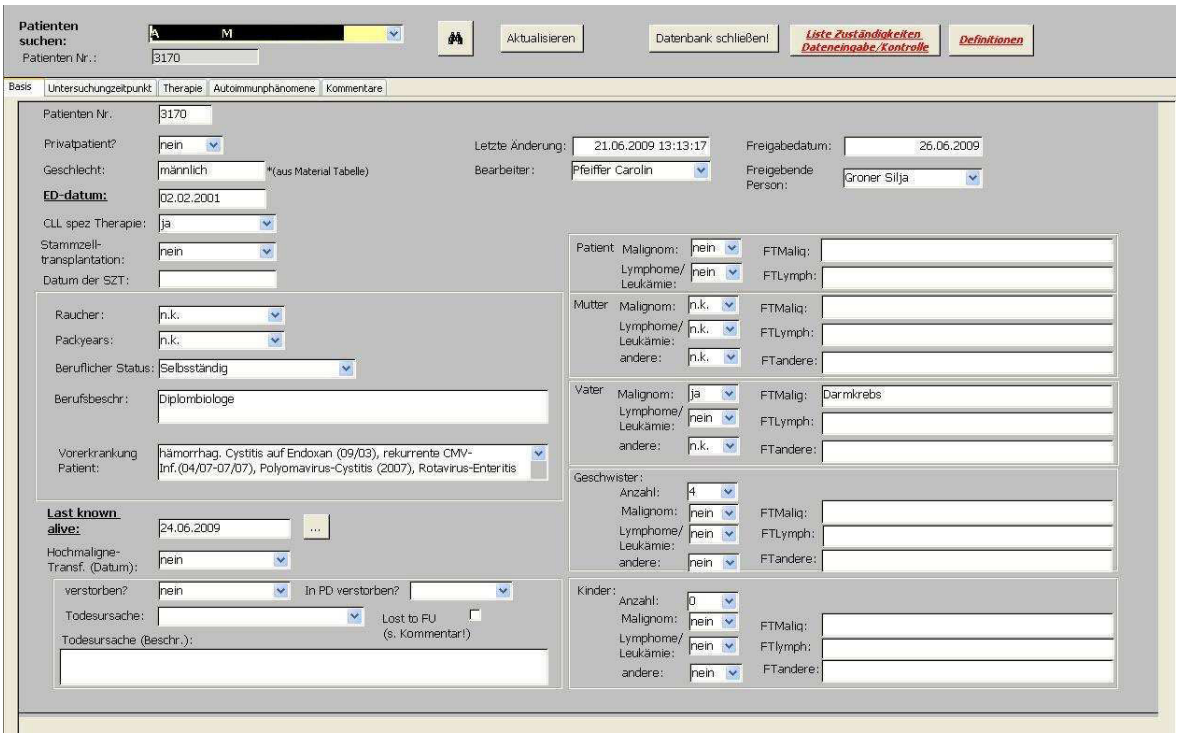

Abbildung 9: Screenshot der **Basisseite** unserer klinischen CLL-Datenbank. Nach Aufrufen des gewünschten Patienten durch Eingabe seines Namens in das schwarz hinterlegte Feld in der Kopfzeile ermöglicht die Menüzeile den Zugriff auf die zugehörigen Karteikarten. Bei Anklicken der Registerkarte „*Basis*“ öffnet sich die abgebildete Karteikarte, auf der allgemeine Daten zur Eigen- und Familienanamnese (entsprechend Tabelle 5) abgefragt werden.
CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *n.k.*, **n**ot **k**nown; *PD*, **P**rogressive **D**isease; *FU*, **f**ollow-**u**p.

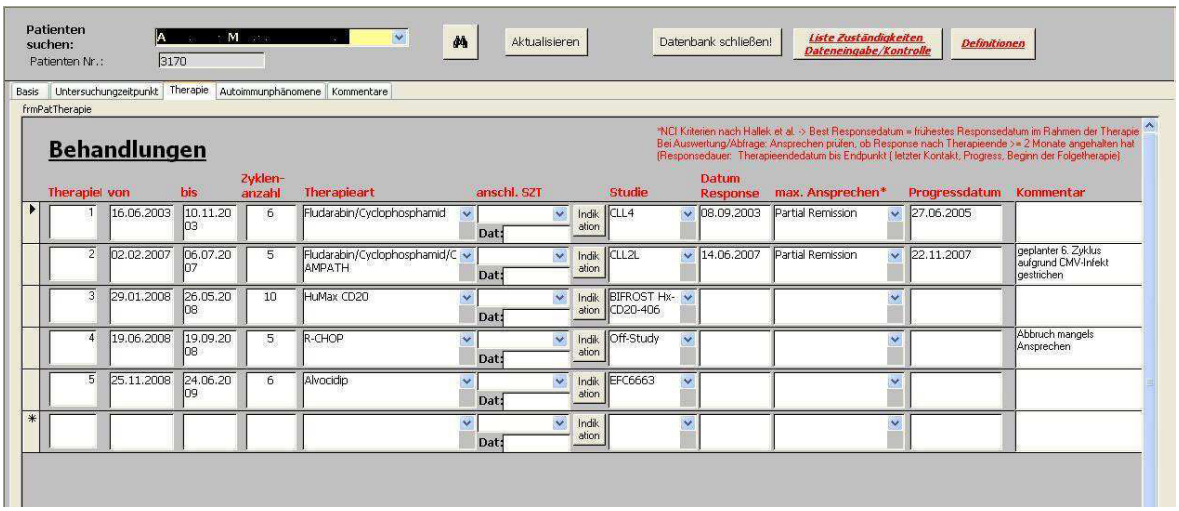

Abbildung 10: Screenshot des **Therapie-Formulars** der CLL-Datenbank. Über die Menüzeile ist eine Abfrage der erfolgten CLL-spezifischen Therapien möglich. Diese sind in chronologischer Reihenfolge und unter Angabe der Zyklenanzahl aufgeführt. Erfolgte die Therapie im Rahmen einer Studie (z.B. *CLL4, CLL2L, BIFROST Hx-CD20-406*), so ist dies ebenfalls hier dokumentiert. Die Bewertung des Therapieansprechens erfolgt anhand der Remissionskriterien nach *Hallek et al. 2008* (siehe hierzu Tabelle 8).

Die Karteikarte zur Erfassung des Untersuchungszeitpunktes (Abbildung 11) ist mehrschichtig aufgebaut, d.h. sie gewährt Zugriff auf untergeordnete Register, in denen klinische Charakteristika, Laborwerte, FACS-Befunde und Begleiterkrankungen (CIRS=cumulative illness rating scale) dokumentiert werden.

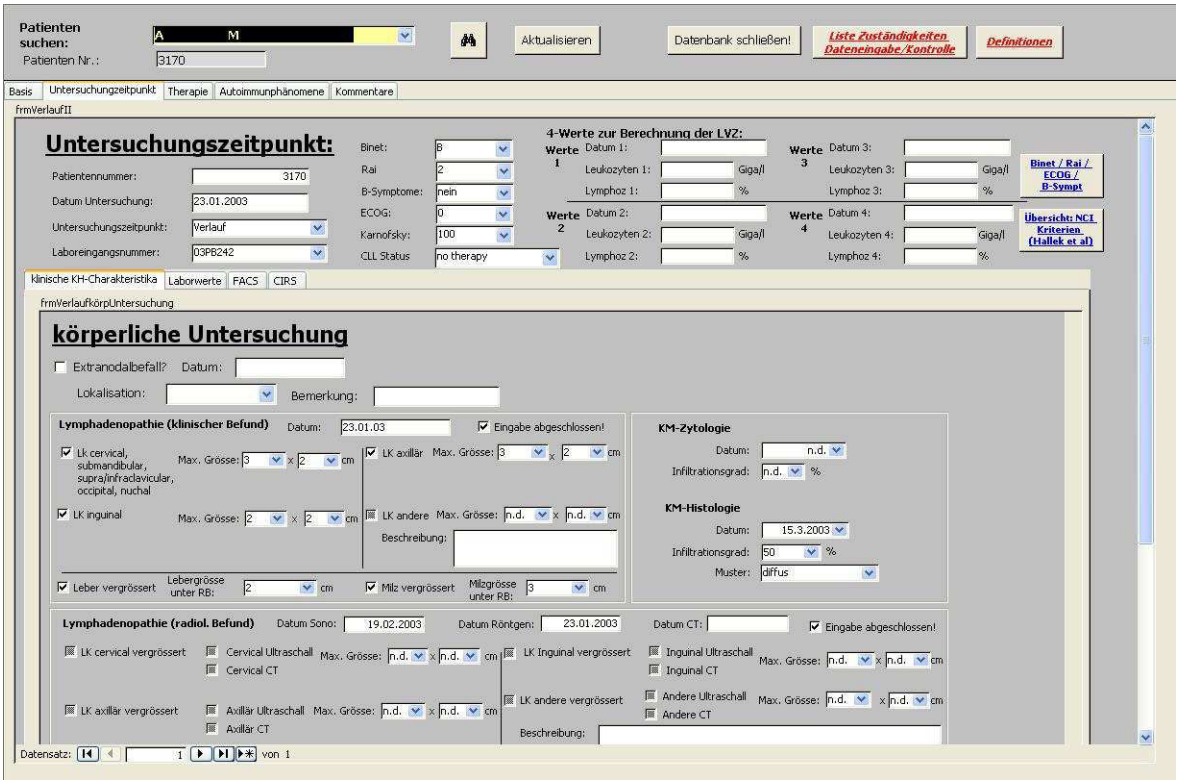

Abbildung 11: Der Screenshot zeigt die Maske, die in unserer klinischen Datenbank der Erfassung des **Untersuchungszeitpunktes** dient. Im oberen Drittel der Karteikarte befindet sich das Feld „Laboreingangsnummer“. Hier sind die Codenummern sämtlicher Laboreingänge des jeweiligen Patienten hinterlegt, was die Zuordnung von klinischen und genetischen Informationen ermöglicht. Direkt unterhalb dieses Feldes befindet sich eine weitere Menüzeile, die den Zugriff auf 4 untergeordnete Registerkarten mit Informationen zu klinischen Krankheitscharakteristika, Laborwerten, Durchflusszytometrie (FACS) und CIRS erlaubt.
CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *FACS*, **f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting,
CIRS, **c**umulative **i**llness **r**ating **s**cale; *LK*, **L**ymph**k**noten; *KM*, **K**nochen**m**ark; *RB*, **R**ippen**b**ogen;
CT, **C**omputer**t**omographie; *n.d.*, **n**ot **d**one.

2.2. Tumorgenetik

Zur Untersuchung möglicher Assoziationen ausgewählter SNPs mit dem Krankheitsverlauf der CLL werden die Stammdaten aus unserer klinischen Datenbank mit den zugehörigen Laborergebnissen verknüpft. Die eindeutige Zuordnung der klinischen und genetischen Informationen erfolgt anhand der oben erwähnten Codenummern der Materialeingänge, welche in der klinischen Datenbank hinterlegt sind.

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle ein Überblick über diejenigen Labormethoden gegeben werden, die im Rahmen unserer Untersuchungen zur Detektion der SNPs dienten.

2.2.1. Detektion des *MDM2*-SNP309 mittels DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)

Als Alternative zur Direktsequenzierung nach *Sanger et al. (1977)* wurde 1995 von *Oefner* und *Underhill* erstmals die DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) als ein Verfahren zur Mutationsdetektion beschrieben, die preiswerter und schneller durchführbar ist (*Wagner et al. 1999*).

Hierzu wurde in unserem Fall mittels PCR ein 203-bp DNA-Produkt aus der *MDM2*-Promotor-Region, die den spezifischen SNP enthält, generiert. Durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur lagern sich die entstandenen Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Weichen die Sequenzen, wie beim heterozygoten *MDM2*-SNP, an einer bestimmten Stelle voneinander ab, so bilden sich Heteroduplices mit Basenpaarungen außerhalb des Watson-Crick-Systems, wie z.B. *G-T*. In gleicher Menge entstehen Homoduplices, bei welchen die gegenüberliegenden Basen komplementär sind (siehe Abbildung 12).

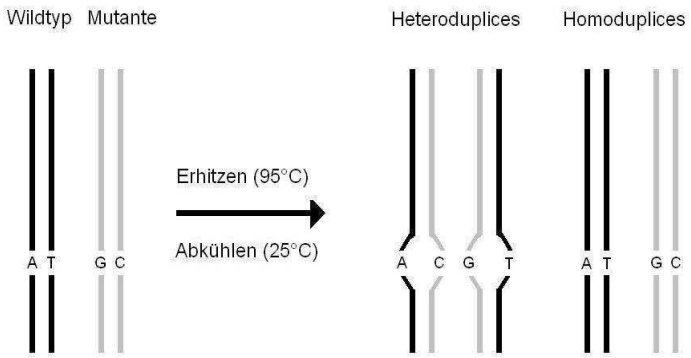

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Homo- und Heteroduplex-Bildung. Nach Denaturierung entstehen durch Hybridisierung Homo- und Heteroduplices in gleicher Menge. Heteroduplices tragen Basen-Mismatches und sind dadurch weniger thermostabil (nach *Schwarzer 2000).*

Die entstandenen Heteroduplices können nun aufgrund der veränderten physikalischen Eigenschaften der Doppelstrang-DNA durch Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie von den Homoduplices getrennt werden. Das hierfür von uns eingesetzte Transgenomic Wave instrument verwendet eine DNA-Trennungssäule mit C18-alkylierten Polystyren-Divinylbenzol Partikeln als stationäre Phase.

Das Erkennen von Sequenzvarianten mittels DHPLC ist stark abhängig von der Analysetemperatur, welche in unserem Fall empirisch ermittelt wurde. Eine zuverlässige Detektion des heterozygoten SNP309(*GT*) gelang bei 64,2°C (siehe Abbildung 13, *oben*). Zur Differenzierung der homozygoten SNP-Konfigurationen (*GG* vs. *TT*) erwies sich eine Temperatur von 66,5°C als optimal, da sich hier für die *TT*-Variante ein breiterer Peak im Chromatogramm ergab (siehe Abbildung 13, *unten*).

Die Auswertung erfolgt computergestützt in einem Absorptions-Zeit-Chromatogramm (siehe Abbildung 13). Bei Vorliegen von Heteroduplices (*GT*) zeigt das Chromatogramm zwei Peaks, der erste verursacht durch die thermolabileren Heteroduplices, der zweite durch die Homoduplices. Entstehen nur Homoduplices (*GG* bzw. *TT*), so resultiert ein homogener Peak im Chromatogramm. In unklaren Fällen wurde die Probe im Anschluss einer automatisierten Fluoreszenzsequenzierung mit dem Big Dye Terminator Kit und

ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems) zugeführt, um die Nukleotidsequenz und das Vorliegen von SNPs zu überprüfen.

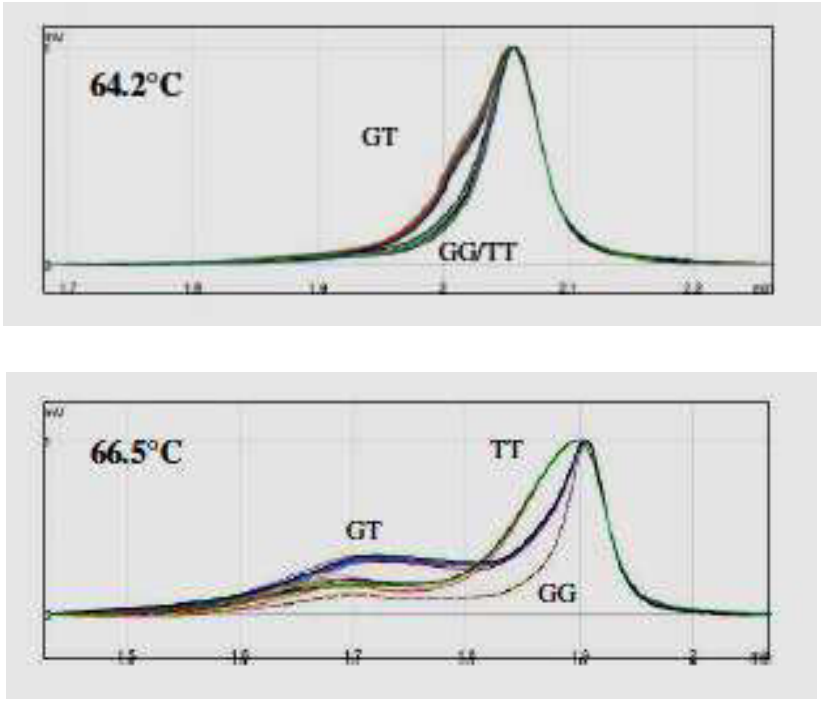

Abbildung 13: Gemitteltes Absorptions-Zeit-Chromatogramm multipler DNA-Proben mit unterschiedlichen *MDM2*-SNP309 Sequenzen bei unterschiedlichen Analysetemperaturen. Bei Vorliegen von Heteroduplices (*GT*) zeigt das Chromatogramm zwei Peaks, der erste verursacht durch die thermolabileren Heteroduplices, der zweite durch die Homoduplices (*GG* bzw. *TT*).

2.2.2. Bestimmung des *BCL2 -938*-Genotyps

Der Genotyp des *-938C>A*-Polymorphismus wurde mit Hilfe einer „Slowdown PCR" bestimmt, welche die Amplifikation GC-reicher Sequenzen erlaubt.

Dazu wurde zunächst die DNA mit dem QIAamp blood kit (Qiagen, Hilden, Germany) entsprechend den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

Folgende Primer kamen zum Einsatz:
forward Primer, 5'-*AGCAGCTTTTCGGAAAATG*-3`;
biotinylierter *reverse* Primer, 5`-*TATCCACGGGACCGCTTCAC*-3`.

Die PCR wurde unter Verwendung von Eppendorf *Taq* PCR Mastermix (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in 48 Zyklen mit je 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei einer anfänglichen Temperatur von 70°C, die schrittweise jeden dritten Zyklus um 1°C auf letztlich 53°C gesenkt wurde, und einer Primer-Extensionszeit von 40 Sekunden durchgeführt. Es folgten 15 zusätzliche Zyklen, mit einer Annealing Temperatur von 58°C. Bei der gesamten Durchführung wurde eine reduzierte Erwärmungsgeschwindigkeit von 2,5°Cs^{-1} und eine besonders langsame Kühlungsrate von 1°Cs^{-1} gewählt.

Die 134-bp PCR-Produkte wurden mit dem PSQ96-System unter Verwendung des Primers 5`-*TCCCCGGCTCCTTCATCGTC*-3` nach Anleitung des Herstellers (Biotage, Uppsala, Schweden) pyrosequenziert. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit der PSQ96 SNP Software.

2.3. Statistische Methoden

Die Vereinbarkeit der Genotypen-Verteilung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde für die von uns untersuchten Kohorten mit dem Exakten Fisher-Test geprüft.

Als primäre Endpunkte untersuchten wir das Gesamtüberleben (OS=**o**verall **s**urvival), sowie die Zeit bis zur Ersttherapie (TFT=**t**ime to **f**irst **t**reatment). Das OS umfasst allgemein die Zeitspanne von der Erstdiagnose bis zum Tod. Zensiert man die OS-Zeiten derjenigen Patienten, die nicht infolge der CLL sondern aus anderen Gründen verstarben oder beim letzten follow-up am Leben waren, so spricht man vom LSS (=**l**eukemia **s**pecific **s**urvival). Die TFT wurde vom Datum der Erstdiagnose bis zur ersten durchgeführten Therapie berechnet. Patienten, die sich keiner Therapie unterzogen hatten, wurden zensiert.

Prognosefaktoren für OS und TFT wurden mit Hilfe des Cox-Modells untersucht. Neben den SNPs beinhalteten die Modelle das Alter bei Diagnosestellung (Cutoff-Level: 60 Jahre), das Binet-Stadium (*A* vs. *B* o. *C*) und molekulargenetische Risikomarker (z.B. IGHV-Status, FISH 11q- und 17p-) als zusätzliche Kovariablen. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs wurden adjustierte Hazard-Ratios berechnet. Im Gegensatz zu *Nückel et al. (2007)* wurden fehlende Daten für Kovariablen durch Schätzwerte ersetzt, welche mit Hilfe einer Technik multipler Imputationen, die mit Kettengleichungen arbeitet, generiert wurden (*van Buuren 2007; Hmisc package accessed July 2007).*

Der Wilcoxon-Rangsummentest diente zum paarweisen Vergleich der Altersverteilung bei Erstdiagnose zwischen den untersuchten Kohorten. Die Altersverteilung zwischen den drei *MDM2*-SNP309-Genotypen wurde mittels des Kruskal-Wallis-Testes verglichen (*Kruskal u. Wallis 1952*).

Ein möglicher Einfluss des *MDM2*-SNP309-Genotyps auf die Inzidenz von Zweitmalignomen und Krebserkrankungen in der Familienanamnese wurde auf Basis eines logistischen Regressionsmodells analysiert.

Das „follow-up“ wurde nach der Methode von Korn (*Korn 1986*) berechnet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der *p*-Wert <0,05 war.

Die statistischen Berechnungen zum *MDM2*-SNP309 wurden in R, Version 2.4.1., mit Erweiterung durch die Zusatzprogramme: *Genetics*, Version 1.2.0, *Design*, Version 2.0-12 und *Hmisc*, Version 3.3-1 durchgeführt.

Die statistischen Berechnungen zum *BCL2*-SNP-*938C>A* wurden in R, Version 2.6.1, mit Erweiterung durch die Zusatzprogramme: *Genetics*, Version 1.3.2, *Design*, Version 2.1-1 und *Hmisc*, Version 3.4-3, sowie mit SPSS für *Windows® 13.0* (SPSS, Chicago IL) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Gemäß unserer eingangs erläuterten Zielsetzung haben wir den Einfluss zweier SNPs auf den Krankheitsverlauf der CLL in der von uns rekrutierten Kohorte überprüft.

3.1. Der Einfluss des *MDM2*-Promotor-Polymorphismus auf den Krankheitsverlauf der CLL

Wir verglichen 467 CLL-Patienten unserer Datenbank mit einer Kontrollgruppe von 1065 gesunden deutschen Blutspendern im Alter zwischen 26 und 68 Jahren (*Wilkening et al. 2006*).

Wir konnten zeigen, dass die Genotypen-Verteilung in unserem Probenset mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht übereinstimmt. Aus Tabelle 9 ist ersichtlich, dass die Häufigkeit der Genotypen in der Patientengruppe (*GG*: 12%, *GT*: 49%, *TT*: 39%) in etwa derjenigen der Kontrollgruppe (*GG*: 14%, *GT*: 44%, *TT*: 41%) entsprach. Auch unterschiedliche Patientensubgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Polymorphismus: So war die Verteilung der *MDM2*-Genotypen in allen Binet-Stadien annähernd identisch, unter männlichen und weiblichen Probanden ergaben sich ebenfalls ähnliche Verteilungsmuster und es lag auch keine Assoziation des *MDM2*-SNP mit weiteren genetischen Markern, wie z.B. der Deletion 17p- oder dem IGHV-Mutationsstatus, vor.

Aufgrund des häufigen Auftretens von Zweitmalignomen bei CLL-Patienten untersuchten wir einen Teil der Kohorte (*n=215*) in dieser Hinsicht genauer. Wir fanden jedoch keine signifikante Assoziation des *MDM2*-Polymorphismus mit der Inzidenz von Zweitmalignomen (*Likelihood Ratio Test; p=0,78*).

Analog betrachteten wir das Auftreten von familiären Krebserkrankungen (d.h. bei Eltern, Geschwistern oder Kindern) in den unterschiedlichen Genotyp-Gruppen. Tabelle 9 zeigt die Häufigkeitsverteilung der *MDM2*-Genotypen in

Familien mit und ohne Auftreten von Krebsleiden (*n=210*). Ein Einfluss von Seiten des *MDM2*-SNPs ist hieraus nicht ersichtlich (*Likelihood Ratio Test; p=0,38*).

Auch die Unterschiede im Alter bei Diagnosestellung unter Beachtung des *MDM2*-SNP309-Genotyps waren nicht signifikant (*Kruskal-Wallis Test; p=0,42*).

Tabelle 9: *MDM2*-Genotypen-Verteilung bei den CLL-Patienten der Ulmer Datenbank im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von 1065 gesunden deutschen Blutspendern im Alter zwischen 26 und 68 Jahren. Sowohl bei Betrachtung aller Probanden als auch nach Bildung klinischer bzw. genetischer Subgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Häufigkeitsverteilung der *MDM2*-Genotypen.

Subgruppe	**GG** Anzahl (%)	**GT** Anzahl (%)	**TT** Anzahl(%)	Gesamt-anzahl
Kontrolle	150 (14%)	470 (44%)	445 (41%)	1065
CLL	54 (12%)	230 (49%)	185 (39%)	467
Binet A	32 (11%)	143 (49%)	118 (40%)	292
Binet B	12 (14%)	49 (56%)	27 (31%)	87
Binet C	2 (7%)	17 (63%)	8 (30%)	27
Frauen	22 (13%)	80 (48%)	65 (39%)	167
Männer	23 (11%)	150 (50%)	118 (39%)	300
Deletion 17p-	2 (9%)	7 (39%)	14 (61%)	23
Deletion 11q-	6 (8%)	38 (53%)	27 (38%)	71
Trisomie 12q	6 (8%)	34 (45%)	34 (46%)	74
Deletion 13q-	20 (8%)	125 (49%)	110 (43%)	255
VH mutiert	26 (13%)	90 (44%)	87 (43%)	203
VH unmutiert	27 (11%)	126 (52%)	90 (37%)	243
Zweitmalignom	2 (8%)	13 (54%)	9 (38%)	24
kein Zweitmalignom	24 (13%)	92 (48%)	75 (39%)	191
Pos. Familienanamnese	17 (16%)	55 (51%)	35 (33%)	107
Neg. Familienanamnese	9 (9%)	49 (48%)	45 (44%)	103

Pos. Familienanamnese, Krebserkrankungen bei Eltern, Geschwistern oder Kindern bekannt;
Neg. Familienanamnese, keine Krebserkrankungen bei Eltern, Geschwistern oder Kindern bekannt;
CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie.

Im Rahmen unserer Untersuchungen führten wir auch eine Überlebenszeitanalyse durch. Abbildung 14 veranschaulicht unsere Ergebnisse in Form eines Kaplan–Meier Diagrammes: Für alle drei Allel-Konstellationen des *MDM2*-SNP309 (*GG, GT, TT*) wurden die Wahrscheinlichkeiten (Y-Achse) berechnet, nach bestimmten Beobachtungszeiten (X-Achse) noch am Leben zu sein. Der Vergleich der drei Kurven ergab nahezu identische Überlebenswahrscheinlichkeiten nach einem (Ablesung bei 12 Monaten auf der X-Achse), fünf (Ablesung bei 60 Monaten auf der X-Achse) und zehn Jahren (Ablesung bei 120 Monaten auf der X-Achse). Auch die mittleren Überlebenszeiten unterschieden sich nicht signifikant.

Folglich ist anzunehmen, dass der *MDM2*-SNP309 keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (OS) von CLL-Patienten hat (*p=0,96*).

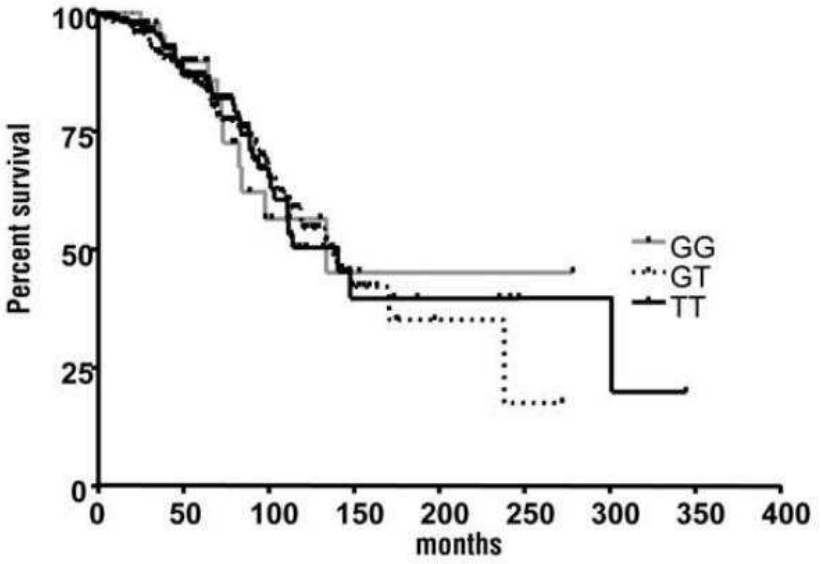

Abbildung 14: Kaplan-Meier Diagramm für das Gesamtüberleben in der CLL-Kohorte unserer Datenbank in Abhängigkeit vom *MDM2*-Genotyp. Die Wahrscheinlichkeit (Y-Achse) nach einer bestimmten Beobachtungszeit (X-Achse) noch am Leben zu sein ist für alle drei *MDM2*-Allel-Konstellationen (*GG, GT, TT*) vergleichbar groß. Der *MDM2*-SNP309 scheint folglich keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben von CLL-Patienten zu haben (*p=0,96)*.

Auch mit Hilfe des Cox-Modells ließ sich kein signifikanter Zusammenhang des *MDM2*-SNP309 mit dem OS oder der TFT nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte der prognostische Wert etablierter Risikomarker an unserem Studienkollektiv eindeutig bestätigt werden (*p<0,001*) (siehe auch Tabelle 10):

Wie erwartet erwies sich das Binet-Stadium als aussagekräftiges Prognosekriterium für den klinischen Ausgang. So ermittelten wir für Patienten im Stadium Binet *A* eine fast doppelt so hohe Überlebenswahrscheinlichkeit wie für diejenigen im Stadium *B* (*HR B:A=1,99; 95%KI=1,19-3,32*). Im Vergleich mit Patienten im Stadium *A* nach Binet war das Todesrisiko im Stadium *C* um 264% erhöht (*HR C:A=3,64; 95%KI=1,65-8,04).*

Auch der Einfluss des Patientenalters auf das OS konnte gesichert werden. Ein bei Diagnosestellung Vierzigjähriger z.B. hat demnach eine doppelt so hohe

Überlebenschance wie ein Patient, der bereits zehn Jahre älter ist (*HR=2,03; 95%KI=1,58-2,62*).

Wir nahmen eine molekulargenetische Risikostratifikation auf Basis etablierter Prognosemarker vor, wozu wir folgende vier Risikogruppen in absteigender Ordnung definierten:

Gruppe IV(höchstes Risiko): 17p- (*n=23*);

Gruppe III: 11q- aber nicht 17p- (*n=71*);

Gruppe II: VH nicht mutiert ohne 17p- oder 11q- (*n=167*);

Gruppe I: VH mutiert ohne 17p- oder 11q- (*n=191*).

Der Vergleich dieser Risikogruppen bezüglich des OS ergab jeweils in Bezug zu Gruppe I für Gruppe II ein 3,5-faches, für Gruppe III ein 6,4-faches und für Gruppe IV ein mehr als 12-faches Todesrisiko. Alle diese Ergebnisse waren hochsignifikant (*OS: p<0,001*) und sprechen für die Repräsentativität unseres Patientenkollektivs (siehe auch Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse des Cox-Modells für das Gesamtüberleben (OS) und die Zeit bis zur Ersttherapie (TFT) in der CLL-Kohorte unserer Datenbank in Ulm (*p<0,001*). Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen der *MDM2*-Konfiguration und OS oder TFT. Im Gegensatz dazu ließ sich jedoch der Einfluss etablierter Risikofaktoren (Alter, Binet-Stadium, Molekulargenetik) an unserem Patientengut eindeutig bestätigen.

	OS (*n=467*; d†=108)		**TFT** (*n=467*, t‡=270)	
Variable	*HR*	*95%KI*	*HR*	*95%KI*
MDM2-SNP309				
T/G : G/G	0,74	0,37-1,45	0,79	0,52-1,01
T/T : G/G	0,74	0,37-1,51	0,87	0,56-1,34
Alter (10 Jahre Unterschied)	2,03	1,58-2,62	1,07	0,93-1,23
Binet-Stadium				
B : A	1,99	1,19-3,32	2,73	2,11-3,72
C : A	3,64	1,65-8,04	2,71	1,63-4,51
Molekulargenet. Risikogruppe				
II : I	3,51	1,82-6,77	3,00	2,13-4,23
III : I	6,35	3,13-12,89	3,65	2,43-5,46
IV : I	12,19	5,22-28,45	5,46	3,16-9,44

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *OS*, Gesamtüberleben (engl. **o**verall **s**urvival); *TFT*, Zeit bis zur Ersttherapie (engl. **t**ime to **f**irst **t**reatment); †d, Anzahl der Todesfälle (engl. **d**eaths), ‡t, Anzahl der behandelten Patienten (engl. **t**reated); *HR*, **H**azard **R**atio; *KI*, **K**onfidenz**i**ntervall; vier molekulargenetische Risikogruppen in absteigender Ordnung: IV:17p-, III:11q- aber nicht 17p-, II:VH nicht mutiert ohne 17p- oder 11q-, I:VH mutiert ohne 17p- oder 11q-.

Analog untersuchten wir die Zeitspanne bis zur Initiierung einer ersten Therapie (TFT) (siehe Tabelle 10). Die Vermutung, dass eine solche bei Vorliegen eines GG-Polymorphismus mit schnellerer Krankheitsprogression im Mittel früher indiziert sein könnte, bestätigte sich jedoch nicht (*HR T/G:G/G=0,79; 95%KI=0,52-1,01*; *HR T/T:G/G=0,87; 95%KI=0,56-1,34; p=0,52*). Dagegen bestand mit fortschreitendem Binet-Stadium deutlich früher eine Therapienotwendigkeit (*HR: B/A=2,73; C/A=2,71*).

In unserer Kohorte war auch bei Vergleichen innerhalb der Patientenreihen mit mutiertem bzw. nicht mutiertem VH-Status kein Einfluss der Genotypen auf Gesamtüberleben oder Ersttherapie ersichtlich.

Insgesamt konnten wir in unserer großen Kohorte von CLL-Patienten keinerlei Effekt des *MDM2*-Promotor-Polymorphismus auf Erkrankungsalter, -verlauf oder -ausgang feststellen, was darauf hindeutet, dass der SNP309 keinen Einfluss auf die Manifestation der CLL hat.

3.2. Der Einfluss des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus auf den Krankheitsverlauf der CLL

Die Genotypen-Verteilung war in den beiden Patientengruppen aus Ulm und Essen sowie in der Kontrollgruppe (siehe *Nückel et al. 2007*) ähnlich [CLL-Kohorte Ulm vs. CLL-Kohorte Essen vs. Kontrolle *BCL2 -938* (*AA/AC/CC*): (81/139/47); (42/55/26); (36/63/21)] und mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vereinbar.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus Essen konnten wir in der CLL-Kohorte aus Ulm jedoch keine Assoziation zwischen dem *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus und klinischen oder genetischen Parametern bei Erstdiagnose feststellen (siehe auch Tabelle 11):

Unabhängig vom vorliegenden Polymorphismus befanden sich gut zwei Drittel der Patienten bei Erstdiagnose im Stadium Binet *A* und der Anteil der Patienten im fortgeschrittenen Stadium Binet *C* war in der Gruppe mit dem *AA*-Polymorphismus nicht höher als bei den beiden anderen Allel-Kombinationen (*AC* bzw. *CC*). Sowohl der IGHV-Mutationsstatus als auch die mit FISH nachgewiesenen Aberrationen (13q-, 13q- single, 11q-, 12q, 17p-) waren bei allen *BCL2 -938*-Konstellationen anteilsmäßig ähnlich häufig vertreten.

Tabelle 11: Verteilung klinischer und genetischer Parameter bei Erstdiagnose unter den CLL-Patienten unserer Datenbank in Abhängigkeit vom *BCL2*-Genotyp.
Alle untersuchten klinischen und genetischen Parameter treten in den untersuchten Subgruppen (*BCL2*-Genotyp *AA* vs. *AC* vs. *CC*) in etwa gleicher Häufigkeit auf.

	AA	***%***	***AC***	***%***	***CC***	***%***	**n.a.**	***p*-Wert**
Binet *A*	43	*72*	77	*66*	22	*63*	3	
Binet *B*	13	*22*	28	*24*	10	*29*	1	*p*=0,90
Binet *C*	4	*7*	11	*9*	3	*9*	0	
n.a.	21		23		12		0	
IGHV								
Mutiert	32	*43*	54	*43*	22	*49*	1	
Unmutiert	43	*57*	73	*57*	23	*51*	2	*p*=0,76
n.a.	6		12		2		1	
FISH								
Normal	21	*27*	39	*30*	11	*24*	2	*p*=0,77
13q-	45	*58*	66	*50*	24	*53*	2	*p*=0,60
13q- single	33	*42*	47	*36*	16	*36*	1	*p*=0,64
11q-	10	*13*	22	*17*	9	*20*	1	*p*=0,53
12q	7	*9*	11	*8*	8	*18*	0	*p*=0,20
17p-	5	*6*	9	*7*	1	*2*	0	*p*=0,68
Other	2	*2*	4	*3*	1	*2*	0	*p*=1,00
n.a.	3		8		2		0	
Total	**81**		**139**		**47**		**4**	

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *FISH*, **F**luoreszenz-**i**n-**s**itu-**H**ybridisierung; *n.a.*, **n**ot **a**pplicable; Als *normaler* Karyotyp wurde ein Fehlen von Aberrationen an 3q26, 6q21, 11q23, 12q13, 13q14, 14q32 und 17p13 definiert.
"*13q- single*" wurde definiert als Deletion 13q14 ohne eine der anderen Mutationen.

Wir konnten in der Ulmer CLL-Kohorte keinerlei signifikante Unterschiede im LSS in Abhängigkeit vom *BCL2*-Genotyp feststellen (siehe Abbildung 15b, *Log-Rang-Test: p=0,18; Hazard Ratios* siehe Tabelle 12). In der Kohorte aus Essen war hingegen das mittlere leukämiefreie Überleben für Patienten mit dem *AA*-

Genotyp gegenüber jenen mit dem *AC*- oder *CC*-Genotyp signifikant verkürzt (siehe Abbildung 15d, *Log- Rang-Test: p=0,003*; *Hazard Ratios* siehe Tabelle 12).

Ebenso fanden wir bei den Ulmer Patienten keinen statistisch signifikanten *BCL2*-Genotyp-assoziierten Unterschied in der TFT (*Log-Rang-Test: p=0,25*; siehe Abbildung 15a), was wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Essen steht, wo bei CLL-Patienten mit dem *AA*-Genotyp im Schnitt deutlich früher eine Therapieindikation bestand (*Log-Rang-Test: p=0,008*; siehe Abbildung 15c).

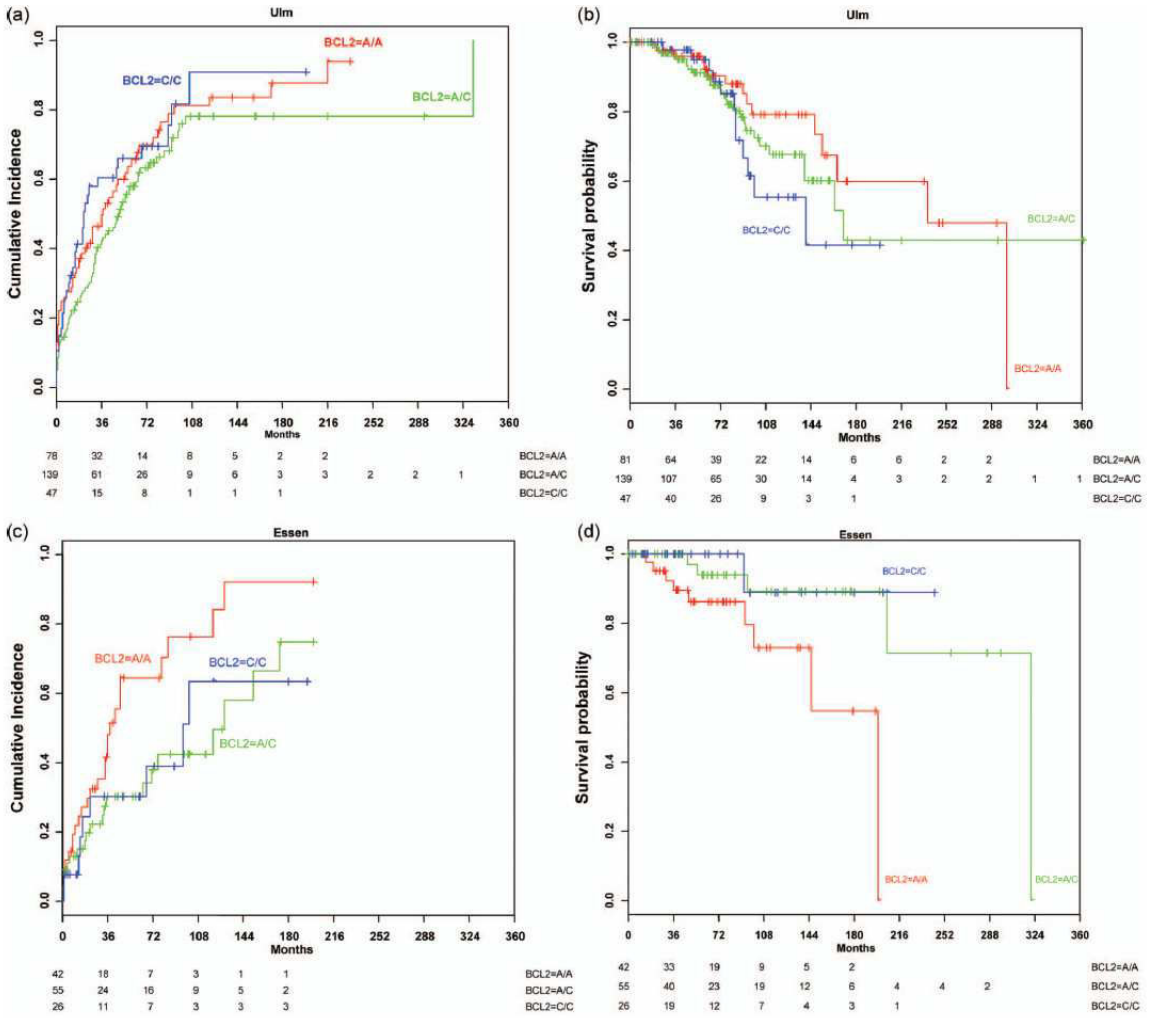

Abbildung 15: Einfluss des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus auf CLL-bedingten Tod und die Zeit bis zur Ersttherapie der CLL. Zeit bis zur Ersttherapie (a) und Leukämie-spezifisches Überleben (b) in den Kohorten von Ulm und Essen (c, d) stratifiziert nach dem *BCL2*-Genotyp.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der in Ulm und Essen geschätzten Hazard Ratios (HR) für CLL-bedingten Tod aufgrund des *BCL2 -938 C>A* Genotyps. In der Kohorte aus Essen ist das mittlere leukämiefreie Überleben für Patienten mit dem *AA*-Genotyp gegenüber jenen mit *AC*- oder *CC*-Genotyp signifikant verkürzt, während bei den CLL-Patienten in Ulm kein Zusammenhang zwischen dem *BCL2*-Polymorphismus und dem LSS ersichtlich ist.

ULM	**ESSEN**
HR (*A/C:A/A*)=1,41; 95%KI=0,75-2,66 HR (*C/C:A/A*)=1,77; 95%KI=0,82-3,84 HR (*A/C* o. *C/C:A/A*)=1,50; 95%KI=0,82-2,74	HR (*A/C:A/A*)=0,21; 95%KI=0,06-0,77 HR (*C/C:A/A*)=0,14; 95%KI=0,02-1,17 HR (*A/C* o. *C/C:A/A*)=0,19; 95%KI=0,06-0,64

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *LSS*, leukämiespezifisches Überleben (engl. **l**eukemia **s**pecific **s**urvival); *HR,* **H**azard **R**atio; *KI*, **K**onfidenz**i**ntervall.

Auch bei Adjustierung für Alter, Krankheitsstadium, IGHV-Status und häufige zytogenetische Aberrationen sowie unter Berücksichtigung durchgeführter Transplantationen als zeitabhängige Intervention, war in der Ulmer Kohorte kein signifikanter Einfluss des *AA*-Genotyps auf TFT (*p=0,18*) und LSS (*p=0,4*) ersichtlich (siehe Tabelle 13). Als wir diese Analyse für die Kohorte aus Essen unter Berücksichtigung von Alter, Krankheitsstadium, ZAP-70- und CD38-Befund wiederholten, war der *AA*-Genotyp noch immer mit längerer TFT (*p=0,03)* und kürzerem LSS (*p=0,04)* assoziiert (siehe Tabelle 13).

Gewisse Unterschiede zwischen der ursprünglichen Studienkohorte aus Essen und unserer aus Ulm sind jedoch beachtenswert: Neben einer veränderten Altersstruktur (Altersmedian: 57 Jahre in Ulm vs. 59 Jahre in Essen; *p=0,001*), unterschieden sich die TFT (mittlere Zeit: 41 Monate in Ulm vs. 79 Monate in Essen) und das LSS (mittlere Überlebenszeit: 170 Monate in Ulm vs. 321 Monate in Essen) signifikant (*p=0,004* bzw. *p=0,04*), obwohl der Beobachtungszeitraum ähnlich lang war (mittlerer Beobachtungszeitraum: 82 Monate in Ulm vs. 67 Monate in Essen; *p=0,38*). Folglich war der Krankheitsprogress in der Ulmer Kohorte erheblich beschleunigt, was auf Unterschiede im Studienprofil hinweist.

Da die Kohorten aus Ulm und Essen also im Bezug auf die Krankheitsdynamik nicht ganz vergleichbar waren, beschränkten wir unsere Analyse im Folgenden auf die Patienten im Stadium Binet *A*, wobei wir wiederum keinen signifikanten Einfluss des *BCL2*-SNP auf TFT und LSS in der Ulmer Kohorte fanden (*Log-Rang-*

Test: p=0,10 und *p=0,52*). Der Vergleich von LSS und TFT der Patienten im Stadium Binet *A* aus Essen und Ulm ergab keine Unterschiede zwischen den Kohorten mehr (*Log-Rang-Test: p=0,57* und *p=0,88*).

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse des Cox-Modells für OS/LSS und TFT für die CLL-Kohorten aus Ulm und Essen. In der Ulmer Kohorte ist kein signifikanter Einfluss des *BCL2*-Genotyps auf OS/LSS oder TFT nachweisbar, wohingegen in der Kohorte aus Essen Patienten mit dem *AA*-Genotyp deutlich kürzer überleben und deutlich früher eine Therapie benötigen, als jene mit dem *AC*- oder *CC*-Genotyp.

Variable	Effekt	Hazard Ratio für Tod (95% KI)	*p*-Wert
Cox-Regression für **OS/LSS** (Kohorte **Ulm**; *n=267*, *d=55*)			
BCL2	*AA* vs. *AC, CC*	0,62 (0,32-1,18)	0,14
Alter	>60 vs. ≤60	3,90 (1,98-7,68)	<0,001
Binet-Stadium	*B, C* vs. *A*	2,63 (1,26-5,49)	0,01
IGHV-Status	Nicht mutiert/mutiert	2,72 (1,28-5,78)	0,01
11q-	Ja vs. nein	1,24 (0,62-2,48)	0,54
17p-	Ja vs. nein	2,83 (1,18-6,78)	0,02
Cox-Regression für **OS/LSS** (Kohorte **Essen**; *n=123, d=15*)			
BCL2	*AA* vs. *AC, CC*	4,18 (1,06-6,46)	0,04
Alter	>60 vs. ≤60	0,77 (0,21-2,87)	0,70
Binet-Stadium	*B, C* vs. *A*	1,96 (0,49-7,88)	0,35
ZAP70-Status	Positiv vs. negative	2,98 (0,71-12,48)	0,14
CD38-Status	Positiv vs. negativ	1,31 (0,32-5,34)	0,71
Cox-Regression für **TFT** (Kohorte **Ulm;** *n=264*, *t=169*)			
BCL2	*AA* vs. *AC, CC*	1,25 (0,90-1,74)	0,18
Alter	>60 vs. ≤60	1,05 (0,73-1,49)	0,80
IGHV-Status	Nicht mutiert/mutiert	3,44 (2,35-5,03)	<0,001
11q-	Ja vs. nein	1,54 (1,04-2,27)	0,03
17p-	Ja vs. nein	1,53 (0,82-2,84)	0,18
Cox-Regression für **TFT** (Kohorte **Essen**; *n=123*, *t=56*)			
BCL2	*AA* vs. *AC, CC*	1,83 (1,06-3,16)	0,03
Alter	>60 vs. ≤60	1,18 (0,68-2,04)	0,55
ZAP70-Status	Positiv vs. negativ	2,52,(1,19-5,31)	0,02
CD38-Status	Positiv vs. negativ	1,37 (0,68-2,77)	0,38

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *KI,* **K**onfidenz**i**ntervall; *n*, Zahl der untersuchten Patienten (engl. **n**umber); *d,* Zahl der B-CLL-bezogenen Todesfälle (engl. **d**eaths); *t*, Zahl der behandelten Patienten (engl. **t**reated); *OS*, Gesamtüberleben (engl. **o**verall **s**urvival); *LSS*, CLL-spezifisches Überleben (engl. **l**eukemia **s**pecific **s**urvival); *TFT,* Zeit bis zur Ersttherapie (engl. **t**ime to **f**irst **t**reatment).

Der von *Nückel et al.* (2007) postulierte Einfluss des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus auf den Krankheitsverlauf der CLL konnte in unserer Untersuchung an den CLL-Patienten der Ulmer Datenbank also nicht verifiziert werden.

4. DISKUSSION

4.1. Die Bedeutung des *MDM2*-Promotor-Polymorphismus

Ergebnisse von *Gryshchenko et al. (2008)* wiesen auf eine Bedeutung des *MDM2*-SNP309 als prognostischer Marker im Krankheitsverlauf der CLL hin. Diese Autoren zeigten, dass das *MDM2*-SNP309 *G*-Allel mit einem schlechteren Krankheitsausgang vergesellschaftet war, wobei CLL-Patienten mit dem *GG*-Genotyp ein kürzeres Gesamtüberleben und eine kürzere Zeit bis zur Ersttherapie aufwiesen. Auf Grundlage von Regressionsanalysen zwischen SNP309-Genotyp und anderen prognostischen Markern, wie dem IGHV-Mutationsstatus, CD38, ZAP70-Expression und dem Rai-Stadium, identifizierten die Forscher den *MDM2*-SNP309 zudem als unabhängigen Marker für die Vorhersage des therapiefreien Überlebens bei der CLL. Die Beobachtung, dass bei Patienten mit monoallelischer 17p-Deletion (=Lokalisation des TP53-Gens) neben dem *GG*-Genotyp auch der *TG*-Genotyp mit einem signifikant verkürzten therapiefreien Überleben korreliert, lässt vermuten, dass der Einfluss des *MDM2*-SNP309 auf den Krankheitsprogress zumindest teilweise vom TP53-Status und dem damit einhergehenden Gen-Dosis-Effekt abhängig ist.

Es wurde in der Vergangenheit wiederholt gezeigt, dass Patienten mit einer 17p-Deletion eine sehr schlechte Prognose besitzen und das Vorliegen einer 17p-Deletion der stärkste Indikator für einen ungünstigen Ausgang ist (*Döhner et al. 1995, Döhner et al. 2000*). Aus diesem Grund überrascht es, dass *Gryshchenko et al. (2008)* feststellten, der GG-Genotyp sei mit einem noch höheren Todesrisiko und Therapiebedarf assoziiert als eine 17p-Deletion. Es ist außerdem bemerkenswert, dass die Autoren bei keinem ihrer Patienten mit 17p-Deletion eine TP53-Mutation fanden – ganz im Gegensatz zu vielen anderen Berichten (*Zenz et al. 2008, Dicker* et *al. 2009*).

Wir konnten jedoch bei unseren Untersuchungen keinerlei Einfluss des *MDM2*-SNP309 auf Gesamtüberleben oder Krankheitsprogress feststellen. Auch fanden

wir keine Korrelation des Polymorphismus mit dem Binet-Stadium oder anderen Prognosefaktoren der CLL, wie Genomaberrationen und IGHV-Mutationsstatus.

Wir beschäftigten uns außerdem mit der Frage, ob der *MDM2*-SNP309 mit dem Alter bei Diagnosestellung in Zusammenhang steht, da derartige Beobachtungen bei anderen Krebsentitäten gemacht wurden (*Bond et al. 2004, Bond et al. 2006*). Der Vergleich des Alters bei Diagnosestellung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen *MDM2*-Genotypen.

Eine von uns vermutete, erhöhte Frequenz von Zweitmalignomen in Abhängigkeit vom *MDM2*-SNP309 bestätigte sich ebenfalls nicht.

In Einklang mit unseren Ergebnissen steht die Studie von *Kaderi et al. (2010)*, in der Patienten der unterschiedlichen SNP309-Genotypen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in TFT und OS aufwiesen. Der vermutete Einfluss des *MDM2*-SNP309 auf den klinischen Ausgang der CLL wurde also auch von dieser Seite nicht bestätigt, zumal auch hier keine Korrelation zwischen dem *MDM2*-Genotyp und Binet-Stadium, IGHV-Mutationsstatus oder Genomaberrationen ersichtlich war. *Kaderi et al. (2010)* beobachteten zwar eine signifikant andere Verteilung der *MDM2*-SNP309-Genotypen bei Patienten mit Trisomie 12, doch die Bedeutung dieses Befundes, falls er überhaupt eine solche hat, ist derzeit nicht bekannt.

Insgesamt scheint der *MDM2*-SNP309 den klinischen Verlauf der CLL nicht zu beeinflussen und sollte daher auch nicht als neuer Prognosemarker betrachtet werden.

4.2. Die Bedeutung des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus

Wie bereits eingangs erwähnt, ist die Datenlage zur Bedeutung des *BCL2 -938 C>A*-Polymorphismus im Krankheitsverlauf der CLL bislang recht widersprüchlich. Die derzeitigen Kenntnisse über die regulatorischen Funktionen der *BCL2*-Proteinfamilie lassen eine Verknüpfung mit der Pathogenese der CLL biologisch durchaus plausibel erscheinen.
Nückel et al. (2007) präsentierten Ergebnisse, die diesen Erwartungen entsprechen: Sie interpretierten in ihrer Studie die Unterschiede im Gesamtüberleben (OS) und Therapiebedarf (TFT) als direkte Folge allelspezifischer *BCL2*-Aktivität.

Dieser postulierte prognostische Effekt des *BCL2*-Promotor-Genotyps konnte jedoch in keiner der drei darauffolgenden unabhängigen CLL-Kohortenstudien repliziert werden (*Kaderi, Norberg, et al. 2008; Majid et al. 2008; Rossi et al. 2008*). Es soll in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass die allgemeine Akzeptanz und klinische Anwendung von Studienergebnissen aber gerade von deren Replizierbarkeit abhängt. Dies wiederum setzt voraus, dass die verwendete Patientenstichprobe mit der ursprünglichen Kohorte, an der die Ergebnisse gewonnen wurden, vergleichbar ist.

Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für die widersprüchlichen Studienergebnisse zum *BCL2 -938C>A*-SNP verglichen wir 267 Patienten aus Ulm, die in unserer klinischen Datenbank sehr detailliert erfasst wurden, mit der Kohorte aus Essen, an der *Nückel et al. (2007)* ihre Hypothese generierten. Trotz eines Beobachtungszeitraumes von durchschnittlich 78 Monaten, was in etwa jenem der Essener Kohorte entspricht, fanden wir in unserer Kohorte aus Ulm weder in univariaten noch in multivariaten Analysen eine Assoziation des *BCL2*-Genotyps mit OS oder TFT.

Die Verteilung der Binet-Stadien bei Erstdiagnose unterschied sich nicht in den beiden Kohorten aus Ulm und Essen (p=0,91). Da der IGHV-Status in der Kohorte aus Essen nicht verfügbar war und CD38/ZAP70 in unserer Datenbank nicht erfasst wurde, war in Bezug auf diese Charakteristika kein direkter Vergleich möglich. Die Verteilung von genetischen Aberrationen (Gruppe 1: single 13q-;

Gruppe 2: normal oder Trisomie 12; Gruppe 3: 11q- oder 17p-) in den beiden Kohorten zeigte einige Abweichungen (*p=0,10* für den Vergleich der Verteilung von genetischen Aberrationen). Insbesondere wiesen 52% der Patienten aus Essen günstige genetische Aberrationen (13q ohne Trisomie 12, 11q- oder 17p-) auf, im Vergleich zu 39% in Ulm also deutlich mehr (*p=0,04*). In Bezug auf ungünstige genetische Aberrationen (11q- oder 17p-) war das Verhältnis genau umgekehrt: Diese wurden in der Kohorte aus Essen bei 17% der Patienten beobachtet, und damit seltener als in Ulm, wo sie bei 22% nachgewiesen wurden (*p=0,37*).

Der Vergleich der beiden Studienpopulationen zeigte also einen etwas aggressiveren Krankheitsverlauf bei den Ulmer Patienten. Möglicherweise konnten die Ergebnisse der ursprünglichen genetischen Assoziationsstudie von *Nückel et al. (2007)* deswegen nicht repliziert werden, weil sich die untersuchten Kohorten im Hinblick auf den natürlichen Krankheitsverlauf und andere Risikofaktoren unterschieden.

Beim Vergleich des ursprünglichen Datensatzes aus Essen mit den klinischen Daten der drei nachfolgenden Studien von *Majid*, *Kaderi* und *Rossi* erkannten wir Unterschiede in den Eigenschaften der Kohorten, die in Tabelle 14 gegenübergestellt werden.

Die Beobachtung von *Nückel et al. (2007)*, dass der *BCL2*-SNP *-938C>A* anscheinend vorwiegend bei Patienten mit prognostisch günstiger CLL (CD38- und ZAP70 negativ) eine Rolle spielt, könnte zu der Hypothese passen, dass derartige genetische Polymorphismen den Krankheitsverlauf zwar in frühen, nicht jedoch in fortgeschrittenen Stadien beeinflussen. Im Hinblick darauf führten wir eine Analyse durch, die sich ausschließlich auf Patienten im Stadium Binet *A* beschränkte. Doch auch für dieses frühe Krankheitsstadium fanden wir keinen signifikanten Einfluss des Polymorphismus, was dafür spricht, dass in unserer Kohorte aus Ulm keinerlei Effekt des *BCL2*-SNP auf den Krankheitsverlauf anzunehmen ist.

Tabelle 14: Vergleich klinischer und genetischer Charakteristika der vier CLL-Kohorten, an denen *Nückel et al. (2007), Majid et al. (2008*), *Kaderi et al. (2008)* und *Rossi et al. (2008*) die Bedeutung des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus untersucht haben, mit unserer CLL-Kohorte in Ulm.

	Majid ***(n=276)***	**Kaderi** ***(n=268)***	**Rossi** ***(n=182)***	**Nückel** ***(n=123)***	**Ulm** ***(n=267)***
Altersmedian (Jahre)	64	63/65/67*	68/69/70*	59 (*n=121*)	56
Spannweite	30-97	-	60-77	30-93	25-79
Binet *A*	75% (*n=251*)	58% (*n=218*)	73%	70% (*n=114*)	67% (*n=215*)
11q-	-	-	7% (*n=169*)	11% (*n=114*)	16% (*n=257*)
17p-	-	-	11% (*n=171*)	6% (*n=93*)	6% (*n=257*)
11q-/17p-	12% (*n=152*)	-	-	17% (*n=93*)	22% (*n=257*)
IGHV unmut	29% (*n=225*)	57%	36% (*n=177*)	-	56% (*n=250*)
ZAP70+	-	-	-	46% (*n=113*)	-
CD38+	-	48%†	33%‡	37%†	-
OS nach 5 Jahren	-	~ 70-80%	80/76/77%	92%**	92%**
Ø TFT (Monate)	-	~ 12-18 (*n=117*)	-	79	41
TFS nach 5 Jahren	-	20-30%	58/50/46%	58%	39%
TFT für behandelte Pat. (Monate)	28,5 (*n=98*)	-	-	39 (*n=56*)	33 (*n=171)*
BCL-2 (*AA/AC/CC*)	35/46/19%	33/46/21%	26/53/21%	34/45/21%	30/52/18%

CLL, **C**hronische **L**ymphatische **L**eukämie; *OS*, (engl. **o**verall **s**urvival) Gesamtüberleben; *TFS,* (engl. **t**reatment **f**ree **s**urvival) therapiefreies Überleben; **Ø** *TFT,* (engl. **t**ime to **f**irst **t**reatment) durchschnittliche Zeit bis zur Ersttherapie; *unmut*, unmutiert; **AA/AC/CC*; **nicht signifikant.
†Cut 20%. ‡Cut 30%.

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von SNPs als potentiell nützliche prognostische Marker für die CLL in Betracht gezogen. Das Vorliegen bestimmter SNPs innerhalb des *BAX*- (*Saxena et al. 2002*), *P2X7*- (*Thunberg et al. 2002*), *GNAS*- (*Frey et al. 2006*) und *BCL2*- (*Nückel et al. 2007*) Gens wurde mit beschleunigtem Krankheitsprogress und kürzerem Überleben für die betroffenen Patienten in Verbindung gebracht. Keine dieser Hypothesen wurde jedoch in Folgestudien durch unabhängige Forschungsgruppen bestätigt (*Skogsberg et al. 2006; Starczynski et al. 2003; Kaderi, Murray et al. 2008; Kaderi, Norberg et al. 2008; Majid et al. 2008*).

Diese Tatsache sowie auch unsere aktuellen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bisher untersuchten genetischen Polymorphismen bei weitem nicht so handfeste Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der CLL haben wie bereits etablierte Prognosemarker. Studienergebnisse, die in multivariaten Analysen unter Einschluss der wichtigsten bekannten Prognosefaktoren nicht bestätigt werden können, haben keine Relevanz für die Praxis. Da derzeit kein Beleg für einen gesicherten Effekt von SNPs auf den klinischen Verlauf der CLL vorliegt, sind Spekulationen über deren mögliche Rolle in der Entwicklung zielgerichteter Therapien aktuell nicht angebracht.

Dennoch ist die Hypothese, dass gewisse pleiotrop wirksame Gene eine Disposition für die CLL und andere lymphoproliferative Erkrankungen bewirken, gut begründet (*Yuille et al. 2000*) und dahingehender Forschungsaufwand gerechtfertigt. So konnten *Zenz et al.* (*2010*) unlängst die TP53-Mutation als unabhängigen Marker für eine schlechte Prognose der CLL identifizieren und es ist zu erwarten, dass die TP53-Analyse Teil der Standarddiagnostik zur CLL-Therapieplanung wird.

Bisherige Erkenntnisse bezüglich eines Einflusses von SNPs basieren jedoch in der Mehrzahl auf Subgruppenanalysen, die aufgrund der relativ kleinen Ausgangsstichproben mit Vorsicht zu betrachten sind. Auch wenn unsere aktuellen Untersuchungen keine Bedeutung von SNPs im Krankheitsverlauf der

CLL ergaben - bevor keine umfassenden Metaanalysen hierzu vorliegen, ist das letzte Wort nicht gesprochen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der chronisch lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe (B-CLL) handelt es sich um ein indolentes, leukämisch verlaufendes Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), das sich durch eine klonale Akkumulation CD5- (cluster of differentiaton) positiver, immuninkompetenter B-Lymphozyten auszeichnet. Der klinische Verlauf ist extrem heterogen. Während ca. 50% der Patienten bereits bei Erstdiagnose bisweilen imposante Lymphknotenschwellungen aufweisen, bleiben andere über Jahrzehnte asymptomatisch, so dass auf eine therapeutische Intervention verzichtet werden kann.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe klinischer, serologischer und genetischer Marker als Prädiktoren für den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen identifiziert. Während sich einige Marker bereits in der Praxis etabliert haben, wo sie das therapeutische Procedere maßgeblich beeinflussen, wird die Bedeutung von Einzelbasen-Austausch-Mutationen im Genom von CLL-Patienten, den sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms), nach wie vor kontrovers diskutiert. Da die aufgestellten Hypothesen zum Einfluss von SNPs auf die Pathogenese der CLL allesamt auf Untersuchungen kleiner Kohorten ohne ausreichende Kontrollen basieren, erlaubt die aktuelle Studienlage keine objektive Bewertung.

Um der Frage nach der Bedeutung von genetischen Markern, wie den SNPs, im Krankheitsverlauf der CLL nachzugehen, wurde eine klinische Datenbank entwickelt, die 485 CLL-Patienten, deren Blut u./o. Knochenmark im Labor der Universitätsklinik Ulm untersucht wurde, detailliert erfasst. Auf Basis dieses Datensatzes haben wir die recht widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zum *MDM2*-SNP309 und *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus als mögliche Prognosefaktoren in der CLL überprüft. Dabei konnten wir für keinen der beiden Polymorphismen einen Effekt auf das Gesamtüberleben (OS) bzw. das leukämiespezifische Überleben (LSS) oder die Zeit bis zur Ersttherapie (TFT)

feststellen, wohingegen sich für die etablierten Prognosemarker signifikante Assoziationen mit diesen Endpunkten bestätigten.

Wir kommen zu dem Ergebnis, dass der vermutete Einfluss von SNPs auf den Krankheitsverlauf der CLL nicht in dieser Form existiert und daher aktuell keine klinische Bedeutung haben kann. Eine endgültige Aussage sollte jedoch erst nach gründlicher Evaluation im Rahmen von Metaanalysen getroffen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

(1) **Abbott** BL: Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment. *Oncologist* 11: 21-30 (2006).

(2) **Abrisqueta** P, Pereira A, Rozman C,Aymerich M, Giné E, Moreno C, Muntañola A**,** Rozman M, Villamor N, Hodgson K, Campo E, Bosch F, Monserrat E: Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 114: 2044-2050 (2009).

(3) **Binet** JL, Leporrier M, Dighiero G, Charron D, Vaugier G, Merle Beral H, Natali JC, Raphael M, Follezou JY: A clinical staging system of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219-234 (1975).

(4) **Bond** GL, Hu W, Bond EE, , Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ: A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in human. *Cell* 119: 591-602 (2004).

(5) **Bond** GL, Menin C, Bertorelle R, Alhopuro P, Aaltonen LA, Levine AJ: MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women. *J Med Genet* 43: 950-952 (2006).

(6) **Bond** GL, **Levine** AJ: A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene* 26: 1317-1323 (2007).

(7) **Catovsky** D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer M, Bezares R, Pettitt A, Hamblin T, Milligan D, Childet J: Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 230-239 (2007).

(8) **Chao** DT, **Korsmeyer** SJ: BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16: 395-419 (1998).

(9) **Chen** K, Hu Z, Wang L, Sturgis EM, El-Nagger AK, Zhang W, Wei Q: Single-nucleotide polymorphisms of the TP53 binding or response promotor regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28: 2008-2012 (2007).

(10) **Damle** RN, W Tarun**,** Fais F**,** Ghiotto F**,** Valetto A**,** Allen SL**,** Buchbinder A**,** Budman D**,** Dittmar K**,** Kolitz J**,** Lichtman SM**,** Schulman P**,** Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M**,** Chiorazzi N **:** IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-1847 (1999).

(11) **Dicker** F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 23: 117-124 (2009).

(12) **Dighiero** G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M , Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P, Turpin FL, Tertian G, Bichoffe A: Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 338: 1506-1514 (1998).

(13) **Döhner** H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D,Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A,Hunstein W, Peter Lichter P: P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85: 1580-1589 (1995).

(14) **Döhner** H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343: 1910-1916 (2000).

(15) **Dores** GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC, Rabkin CS, Devesa SS, Linet MS: Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 139: 809-819 (2007).

(16) **Dreger** P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E: Indications for allogenic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus: *Leukemia* 21: 12-17 (2007).

(17) **Eichhorst** BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, Siehl S, Jäger U, Bergmann M, Stilgenbauer S, Schweighofer C, Wendtner CM, Döhner H, Brittinger G, Emmerich B, Hallek M: Fludarabin plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107: 885-891 (2006).

(18) **el-Deiry** WS: Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8: 345-357 (1998).

(19) **el Rouby** S**,** Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW: P53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of *MDR1/MDR3* gene expression. *Blood* 82: 3452-3459 (1993).

(20) **Foernzler** D: SNPs – kleine Unterschiede mit großer Wirkung. *BioWorld* 3: 18-20 (2000).

(21) **Frey** UH, Nückel H, Sellmann L, Siemer D, Küppers R, Durig J, Dührsen U, Siffert W: The GNAS1 T393C polymorphism is associated with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 12: 5686-5692 (2006).

(22) **Gryshchenko** I, Hofbauer S, Stoecher M, Daniel PT, Steurer M, Gaiger A, Eigenberger K, Greil R, Tinhofer I: MDM2 SNP309 is associated with poor outcome in B-cell chronic lymphocytiy leukemia. *J Clin Oncol* 26: 2252-2257 (2008).

(23) **Hallek** M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B: Elevated serum thymidin kinase levels identify as a subgroup at high risk of disease progression in early, non-smoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 1732-1737 (1999).

(24) **Hallek** M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ: Guidelines for the diagnosis and treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111: 5446-5456 (2008).

(25) **Hamblin** TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: Unmutated IgV_H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-1854 (1999).

(26) **Hendrix** MJ: De-mystifying the mechanism(s) of maspin. *Nat Med* 6: 374-376 (2000).

(27) **Hirata** H, Hinoda Y, Kikuno N, Suehiro Y, Shahiyari V, Ahmad AE, Tabatabai ZL, Igawa M, Dahiya R: Bcl2 -938C>A polymorphism carries risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 181: 1907-1912 (2009).

(28) **Kaderi** MA, **Murray** F, Jansson M, Merup M, Karlson K, Roos G, Aleskog A, Tobin G: The GNAS1 T393C polymorphism and lack of clinical prognostic value in chronic lymphocytic leukemia. *Leu Res* 32: 984-987 (2008).

(29) **Kaderi** MA, **Norberg** M, Murray F, Merup M, Sundström C, Roos G, Åleskog A, Karlsson K, Axelsson T, Tobin G, Rosenquist R: The *BCL-2* promotor (-938C>A) polymorphism does not predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22: 339-343 (2008).

(30) **Kaderi** MA, Mansouri M, Zainuddin N, Cahill N, Gunnarsson R, Jansson M, Kimby E, Åleskog A, Lundin J, Glimelius B, Melbye M, Juliusson G, Jurlander J, Rosenquist R: Lack of association between the *MDM2* promoter polymorphism SNP309 and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research* 34: 335–339 (2010).

(31) **Karnofsky** DA, **Burchenal** JH: The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. In: MacLeod CM (Ed), Evaluation of Chemotherapeutic Agents. *Columbia University Press* 191-205 (1949).

(32) **Keating** MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, Andreeff M, Cortes J, Faderl S, Thomas D, Koller C, Wierda W, Detry MA, Lynn A, Kantarjian H: Early results of a chemoimmunotherapy regime of fludarabin, cyclophosphamide and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23: 4079-4088 (2005).

(33) **Keshgegian** AA, Johnston E, Gnaan A: *Bcl-2* oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki67) proliferative rate are independant predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 110: 443-449 (1998).

(34) **Klein** U, Tu Y, Gustavo A. Stolovitzky GA,Michela Mattioli M, Giorgio Cattoretti G, Hervé Husson H,Arnold Freedman A,Giorgio Inghirami G, Lilla Cro L,Luca Baldini L, Antonino Neri A,Andrea Califano A, Riccardo Dalla-Favera R: Gene expressian profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 194: 1625-1638 (2001).

(35) **Korn** EL: Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med* 5: 255–260 (1986).

(36) **Kröber** A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: V_H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410-1416 (2002).

(37) Kruskal WH und Wallis WA: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *JASA* 47: 583-621 (1952).

(38) **Lehnerdt** GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nückel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W, Bachmann HS:The regulatory BCL2 promotor polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Annals of Oncol* 20: 1094-1099 (2009).

(39) **Loro** LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC : Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 30:1097-1105 (1999).

(40) **Majid** A, Tsoulakis O, Walewska R, Gesk S, Siebert R, Kennedy DBJ, Dyer MJS: *BCL2* expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): lack of association with BCL2-938A>C promoter single nucleotide polymorphism (SNP). *Blood* 111: 874-877 (2008).

(41) **Monserrat** E, Rozman C: Chronic lymphocytic leukemia: Present status. *Annals of Oncology* 6: 219-235 (1995).

(42) **Montillo** M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E: Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 90: 391-399 (2005).

(43) **Nebe-von-Caron** G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA: Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods* 42: 97-114 (2000).

(44) **Nückel** H, Frey UH, Bau M**,** Sellmann L, Stanelle J, Dürig J, Jöckel KH, Dührsen U, Siffert W: Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109: 290-297 (2007).

(45) **O`Brien** SM, Kantarjian HM, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, Lerner S, Keating M: Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regime in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Onkol* 19:1414-1420 (2001).

(46) **Oefner** PJ, Underhill PA: Comparative DNA sequencing by denaturating high-performance liquid chromatography (DHPLC) [abstract]. *Am J Hum Genet* 57: 266 (1995).

(47) **Ofner** D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Tötsch M, Böcker W, Jasani B, Schmid KW: Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma. Correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 72: 981-985 (1995).

(48) **Oken** MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 5: 649-655 (1982).

(49) **Rai** KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46: 219-234 (1975).

(50) **Rosenwald** A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 194: 1639-1647 (2001).

(51) **Rossi** D, Rasi S, Capello D, Gaidano G: Prognosic assessment of *BCL2*C938A polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111: 466-468 (2008).

(52) **Rummel** M: Diagnostik und Therapie der chronisch-lymphatischen Leukämie. *Der Onkologe* 8: 708-772 (2002).

(53) **Sanger** F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467 (1977).

(54) **Saxena** A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP: Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 187: 199-205 (2002).

(55) **Schwarzer** S: DHPLC spürt Mutationen auf. *Laborpraxis* 24: 28-30 (2000).

(56) **Seifert** M, **Küppers** R: Molecular footprints of a germinal center derivation of human $IgM^+(IgD^+)CD27^+$B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* 206: 2659-2669 (2009).

(57) **Skogsberg** S, Tobin G, Krober A, Kienle D, Thunberg U, Aleskog A, Karlsson K, Laurell A, Merup M, Vilpo J, Sundström C, Roos G, Jernberg-Wiklund H, Döhner H, Nilsson K, Stilgenbauer S, Rosenquist R: The G(-248)A polymorphism in the promoter region of the BAX gene does not correlate with prognostic markers or overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20: 77-81 (2006).

(58) **Starczynski** J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Hoy T, Milligan D, Bentley P, Fegan C: The P2X7 receptor gene polymorphism 1513A→C has no effect on clinical prognostic markers, in vitro sensitivity to fludarabin, Bcl-2 family protein expression or survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br L Haematol* 123: 66-71 (2003).

(59) **Stilgenbauer** S, Eichhorst BF, Busch R, Zenz T, Winkler D, Bühler A, Goede V, Wendtner CM, Lichter P, Emmerich B, Hallek M, Döhner H: Biologic and clinical markers for outcome after fludarabine (F) or F plus cyclophosphamide (FC) – comprehensive analysis of the CLL4 trial of the GCLLSG [abstract]. *Blood* (*ASH Annual Meeting Abstracts*) 112: 2089 (2008).

(60) **Thunberg** U, Tobin G, Johnson A, Soderberg O, Padyukov L, Hultdin M, Klareskog L, Enblad G, Sundström C, Roos G, Rosenquist R: Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 260: 1935-1939 (2002).

(61) **Travis** LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF: Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer* 16: 1422-1427 (1992).

(63) **van Buuren** S: Multiple imputation of discrete and continuous data by fully conditional specification. *Stat Methods Med Res* 16: 219–242 (2007).

(63) **Vogelstein** B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310 (2000).

(64) **Wagner** T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, Oefner P: Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 62: 369-376 (1999).

(65) **Wierda** WG, O`Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do KA, Garcia-Manero G, Cortes J, Thomas D, Koller C, Burger J Lerner S, Kantarjian H, Keating M: Characteristics associated with important clinical endpoints in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* 27: 1637-1643 (2009).

(66) **Wilkening** S, Bermejo JL, Burwinkel B, Klaes R, Bartram CR, Meindl A, Bugert P, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Untch M, Hemminki K, Försti A: The Single Nucleotide Polymorphism IVS1+309 in Mouse Double Minute 2 Does Not Affect Risk of Familial Breast Cancer. *Cancer Res* 66: 646-648 (2006).

(67) **Wilkening** S, Bermejo JL, Hemminki K: MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis* 28: 2262-2267 (2007).

(68) **Yuille** MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS: Familial chronic lymphocytic leukemia: a survey and review of published studies. *British Journal of Haematology* 109: 794-799 (2000).

(69) **Young** RL, **Korsmeyer** SJ: A negative regulatory element in the bcl-2 5`-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 13: 3686-3697 (1993).

(70) **Zenz** T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, Schwänen C, Döhner H, Stilgenbauer S: Mono-allelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in CLL: results from a detailed genetic characterization with long term follow-up. *Blood* 112: 3322-3329 (2008).

(71) **Zenz** T, **Benner** A, Dührsen U, Dürig J, Döhner H, Siffert W, Stilgenbauer S, Nückel H: BCL2-938C>A polymorphism and the disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 50: 1837-1842 (2009).

(72) **Zenz** T, **Mertens** D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nature Reviews Cancer* 10: 37-50 (2009).

(73) **Zenz** T, Benner A, Stilgenbauer S: MDM2 promotor polymorphism and the characteristics in CLL. *Leukemia Research* 34: 578-579 (2010).

(74) **Zhang** GJ, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R: The role of *bcl-2* expression in breast carcinomas [review]. *Oncol Rep* 5: 1211-1216 (1998).

7. ANHANG

7.1. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abbildung 1: Single Nucleotide Polymorphism (aus *Foernzler 2000)*……..……..**9**

Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher Lokalisation von SNPs im Genom (aus *Foernzler 2000)*……..……..**10**

Abbildung 3: Das p53-Netzwerk (modifiziert nach *Vogelstein et al. 2000*)….……**12**

Abbildung 4: Modell für den Einfluss des *MDM2* SNP309 auf das *MDM2*/p53-Level (modifiziert nach *Bond et al. 2007*)…….…….…….…**14**

Abbildung 5: Mitglieder der *BCL2*-Familie (aus *Chao et al. 1998*)…….……...…**15**

Abbildung 6: Aufbau der *BCL2*-Promotorregion (nach *Nückel et al. 2007*)...……**16**

Abbildung 7: Die statistische Power als Funktion der Hazard Ratio und variabler Fallzahlen (aus *Zenz et al. 2010*)……..…...……..**19**

Abbildung 8: Modell für den Auswertungsbogen einer FACS-Analyse….....**26**

Abbildung 9: Screenshot der Basisseite……..…….....**28**

Abbildung 10: Screenshot des Therapie-Formulars…….**28**

Abbildung 11: Screenshot „Untersuchungszeitpunkt“……..……**29**

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Homo- und Heteroduplex-Bildung (nach *Schwarzer 2000)*……...……...…**31**

Abbildung 13: Gemitteltes Absorptions-Zeit-Chromatogramm multipler Proben mit unterschiedlichen *MDM2*-SNP309 Sequenzen …….……..**32**

Abbildung 14: Kaplan-Meier Diagramm für das Gesamtüberleben in unserer CLL-Kohorte in Abhängigkeit vom *MDM2*-Genotyp……...…**38**

Abbildung 15: Einfluss des *BCL2-938 C>A*-Polymorphismus auf CLL-bedingten Tod und die Zeit bis zur Ersttherapie der CLL……...…**42**

7.2. Tabellenverzeichnis Seite

Tabelle 1: Diagnosekriterien der CLL (nach *Hallek et al. 2008*)……..……..….**2**

Tabelle 2: Rai-Klassifikation (nach *Rai et al. 1975*)……..…….…….**3**

Tabelle 3: Binet-Klassifikation (nach *Binet et al. 1975*)……..….**3**

Tabelle 4: Indikationen zur Behandlung der CLL (*Hallek et al. 2008*)……**4**

Tabelle 5: Überblick über die Definitionen der Basisvariablen……....……..….**21**

Tabelle 6: Auszug aus den Definitionen zum Untersuchungszeitpunkt……...….**23**

Tabelle 7: Überblick über erfasste Laborparameter……...…….**25**

Tabelle 8: Remissionskriterien (nach *Hallek et al. 2008*)…….……**27**

Tabelle 9: Genotypen-Verteilung bei den CLL-Patienten der Ulmer Datenbank im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von 1.065 gesunden deutschen Blutspendern im Alter zwischen 26 und 68 Jahren.…….….**37**

Tabelle 10: Ergebnisse des Cox-Modells für das Gesamtüberleben (OS) und die Zeit bis zur Ersttherapie (TFT) in der CLL-Kohorte unserer Datenbank in Ulm…….……**39**

Tabelle 11: Verteilung klinischer und genetischer Parameter bei Erstdiagnose unter den CLL-Patienten unserer Datenbank in Abhängigkeit vom *BCL2*-Genotyp……**41**

Tabelle 12: Gegenüberstellung der in Ulm und Essen geschätzten Hazard Ratios (HR) für CLL-bedingten Tod aufgrund des *BCL2 -938 C>A*-Genotyps ….……..…….**43**

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse des Cox-Modells für OS/LSS und TFT für die CLL-Kohorten aus Ulm und Essen.……...……**44**

Tabelle 14: Vergleich von fünf CLL-Kohorten, an denen die Bedeutung des *BCL2 -938C>A*-Polymorphismus untersucht wurde, im Hinblick auf klinische und genetische Parameter.…….…….…….**49**

8. DANKSAGUNG

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Abteilung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med.Thorsten Zenz für die Überlassung des Themas sowie die exzellente Betreuung und Zusammenarbeit. Er stand mir stets hilfsbereit zur Seite und hatte ein offenes Ohr für alle Probleme, die sich bei meiner Arbeit ergaben.

Frau Silja Mack und Frau Henriette Huber danke ich für ihr Engagement beim Aufbau und der Bestückung unserer Datenbank.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Dr. Brigitte und Dr. Johannes Pfeiffer, für das geduldige Zuhören, die aufbauenden Worte und die Unterstützung während meines gesamten Medizinstudiums.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt