

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

**Hohe Strukturhomologie im Immunglobulin-Schwerketten-
Rearrangement (IgV_H) und ungünstiger Erkrankungsverlauf
bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL)
mit Umlagerung des V_H3-21-Gens unabhängig von der
geographischen Herkunft und dem V_H-Mutationsstatus**

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

Vorgelegt von
Andreas Bühler
Augsburg

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Jörg Fehling

Tag der Promotion: 24.04.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Die CLL/Charakterisierung der Erkrankung	1
1.2. B-Zell Entwicklung und Somatische Hypermutation	2
1.3. Vorhersage der Erkrankungsverlauf/Prognostische Marker bei der CLL	3
1.4. Struktur des I _H -Locus/Mechanismus des VDJ-Rearrangements/ Hierarchischer Mechanismus der Leichtkettenexpression	7
1.5. Fragestellungen der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material	13
2.2. DNA-Präparation	17
2.3. DNA-Amplifikation der VDJ-Schwerkette mittels PCR	18
2.4. Genescan Analyse	27
2.5. Klonierung von PCR-Produkten	29
2.6. Aufreinigung der PCR-Produkte	31
2.7. DNA-Sequenzierung	31
2.8. Bestimmung der KDE-Rearrangements	36
2.9. Bestimmung der CD38-Expression durch FACS-Analyse	39
2.10. Bestimmung der ZAP-70 Expression durch FACS-Analyse	42
2.11. Zytogenetische Analysen	42
2.12. Auswertung der Daten und statistische Analysen	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Charakterisierung der Struktur des V _H 3-21-Gen-Rearrangements	44
3.2. V _L -Gen-Rearrangements/Umlagerung der variablen Leichtketten	53
3.3. Kombinierte V _H + V _L -Gen-Benutzung	55
3.4. Analyse des Kappa-Deleting-Element-Rearrangements	55
3.5. Beziehung zu anderen prognostischen Markern	57

3.6. Überlebensanalysen	60
4. Diskussion	64
4.1. Hohe Übereinstimmung in der B-Zell-Rezeptor-Struktur	64
4.2. Überlebensanalyse der V _H 3-21-Patienten/Korrelation mit weiteren prognostischen Markern (ZAP-70- und CD38-Expression)	68
4.3. Geographische Verteilung von V _H 3-21-Patienten	72
4.4. Immunglobulin-Leichtkettenstruktur	73
4.5. Schlussfolgerung	74
5. Zusammenfassung	75
6.Literaturverzeichnis	77
Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
Austr.	Australien
BAX	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCR	B-Zell-Rezeptor
BLNK	B-Zell Linker Protein
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Albumin Serum
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein (Aminosäure)
°C	Grad Celsius
ccdB Gen	coupled cell division B Gen
CCD-Kamera	Charge Coupled Device-Kamera
CCND2	Cyclin D2
CD	Cluster of Differentiation
CD19-ECD	CD19-Phycoerythrin-Texas-Red (PE-TR)
CD5-FITC	CD5-Fluorescein-5-isothiocyanat
cDNA	complementary DNA
CD5-PC5	CD5-Allophycocyanin
CD3-PE	CD3-Phycoerythrin
CD56-PE	CD56-Phycoerythrin
CDR	Complementary Determining Region des Immunglobulins
C _κ	Constant Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
C _κ KDE	Kombinationssequenz aus Constant Region der Kappa-Leichtkette (C _κ) des Immunglobulins und Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendem-Element (KDE)

CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
C _{μ/δ}	Constant Region Typ μ/δ des Immunglobulins
C-Region	Constant Region/konstante Region des Immunglobulins
Cy 5.5	Cyanin-Farbstoff 5.5
D	Asparaginsäure (Aminosäure)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
Deletion-11q	Deletion am langen Arm von Chromosom Nummer 11
Deletion-13q	Deletion am langen Arm von Chromosom Nummer 13
Deletion-17p	Deletion am kurzen Arm von Chromosom Nummer 17
D _H	Diversity heavy chain/ Diversity Region der Immunglobulin-Schwerkette
D-J _H	Kombinationssequenz aus Diversity- und Joining heavy chain/Kombinationssequenz aus Diversity und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
D-Region	Diversity Region der Immunglobulin-Schwerkette
E	Glutaminsäure (Aminosäure)
EB-Buffer	Elution-Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii/und andere
F	Phenylalanin (Aminosäure)
F.	in frame/innerhalb des Leserahmens bzw. functional/funktionell
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FAM	Blauer GeneScan [®] Farbstoff
FCS	Foetales Kälberserum
FDC-Zellen	Follikuläre dendritische Zellen
Fin.	Finnland
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FR	Framework Region des Immunglobulins
g	Gramm
G	Glycin (Aminosäure)

G.	Gen
Ges.	Gesamtzahl
H	Histidin (Aminosäure)
HCDR3	Heavy chain Complementary Determining Region 3
HEX	Schwarzer GeneScan [®] Farbstoff
Homolog.	Homologie
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
http	hyper text transfer protocol
I	Isoleucin (Aminosäure)
Ig	Immunglobulin
IgD	Immunglobulin Typ D
IgG1/2a	Immunglobulin Typ G1/2a
IgM	Immunglobulin Typ M
Ig _H	Immunglobulin-Schwerkette
Ig _κ	Immunglobulin-Kappa-Leichtkette
Ig _λ	Immunglobulin-Lambda-Leichtkette
Ig _L	Immunglobulin-Leichtkette
Ig _μ	Immunglobulin-Schwerkettenklasse Typ μ
IgV _H	Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette
IMGT	ImMunoGeneTics (Eigennamen der Immunglobulin-Datenbank)
Ital.	Italien
J _H	Joining heavy chain/Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette
3'-J _H -Mix	Mix der Primer mit Angriffspunkt in der Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette am 3'-Ende
5'-J _λ - bzw.-	Mix der 5'-Primer für die Joining Region der Lambda-Leichtkette bzw.
J _κ -Primer- Mix:	Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
J _κ	Joining Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
J _λ	Joining Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins
J _L	Joining light chain/Joining Region der Immunglobulin-Leichtkette
J _κ C _κ	Kombinationssequenz aus Joining Region der Kappa-Leichtkette und Constant Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
J-Region	Joining Region des Immunglobulins
K	Lysin (Aminosäure)

κ -Expression	Expression der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
kb	kilobase
KDE	Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element
λ -Expression	Expression der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins
L	Leucin (Aminosäure)
LB	Loading-Buffer
LCDR3	Light chain Complementary Determining Region 3
Lead.-Reg.	Leader-Region
LDH	Lactat Dehydrogenase
M	Methionin (Aminosäure)
M.	molar (mol pro Liter)
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minute
mm	Millimeter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
N	Asparagin (Aminosäure)
NaCl	Natriumchlorid
NEJM	New England Journal of Medicine
NF.	Out of frame/außerhalb des Leserahmens bzw. non-functional/nicht-funktionell
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
μ l	Mikroliter
Nr.	Nummer
Oligo dT-Primer	Oligodesoxynukleotid-Primer
P	Prolin (Aminosäure)

P27	Cyclin dependent Kinase Inhibitor 1b
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
Pat.	Patient
PB-Buffer	Bindungspuffer/binding buffer aus dem QIAquick [®] PCR Purification Kit
PBS	Phosphated buffered saline
PCR	polymerase-chain-reaction/Polymerase-Kettenreaktion
PE-Buffer	Ethanolhaltiger Waschpuffer aus dem QIAquick [®] PCR Purification Kit
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
pmol	picomol
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
Q	Glutamin (Aminosäure)
R	Arginin (Aminosäure)
Reg.	Region
R-Mutation	Replacement-Mutation
®	amtlich registrierte Marke
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RSS	Recombination Signal Sequence
S	Serin (Aminosäure)
Sek.	Sekunde
S-Mutation	Silent Mutation
SWE	Schweden
SYK	Spleen Tyrosin Kinase
T	Threonin (Aminosäure)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine
Taq-Polymerase	Thermophilus aquaticus Polymerase
TBE	Tris/Borate/EDTA
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TEMED	Tetramethylendiamid
TET	Grüner GeneScan [®] Farbstoff

Trisomie- 12q	Trisomie am langen Arm von Chromosom Nummer 12
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
(TTAGGG) _n	repetitive Nukleobasen-Sequenz: Thymin-Thymin-Adenin-Guanin-Guanin-Guanin am Ende einer DNA-Sequenz.
U	Unit/internationale Enzymeinheit
Übereinstim.	Übereinstimmung
UPN	Patientennummer/Unique Patient Number
V	Valin (Aminosäure)
VDJ	Kombinationssequenz aus Variable-, Diversity- und Joining heavy chain/Kombinationssequenz aus Variable-, Diversity- und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette
V _H	Variable heavy chain/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette
V _H -DJ _H	Kombinationssequenz aus Variable-, Diversity- und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette in ausführlicher Schreibweise (=VDJ)
5´V _H -Lead.- Reg.-Primer	Primer mit Angriffspunkt in der Leader-Region der Immunglobulin-Schwerkette am 5´-Ende
V _H 1,3,4-Mix	Mix der Primer 1,3 und 4 mit Angriffspunkt in der Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette
VJ	Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region des Immunglobulins
V _H -mut.	V _H -mutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette mit weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz
V _H -unmut.	V _H -unmutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette mit mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz
V _κ	Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
V _κ KDE	Kombinationssequenz aus Variable Region der Kappa-Leichtkette und Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element
V _κ J _κ	Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
V _κ - bzw. V _λ - Primer-Mix:	Mix der Primer für die Variable Region der Lambda-Leichtkette bzw. Kappa-Leichtkette des Immunglobulins
V _λ	Variable Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins
V _λ J _λ	Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins

V _L	Variable light chain/Variable Region der Immunglobulin-Leichtkette
V-Region	Variable Region des Immunglobulins
W	Tryptophan (Aminosäure)
WHO	World Health Organization
www	world wide web
Y	Tyrosin (Aminosäure)
ZAP-70	Zeta-associated protein 70
ZAP-70 ⁺	ZAP-70 positiv/mindestens 20% ZAP-70 positive CLL-Zellen in der Probe
ZAP-70 ⁻	ZAP-70 negativ/weniger als 20% ZAP-70 positive CLL-Zellen in der Probe

1. Einleitung

1.1. Die Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (CLL)/Charakterisierung der Erkrankung

Die CLL ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die durch klonale Expansion von kleinen, morphologisch reif erscheinenden B-Lymphozyten charakterisiert ist. Es handelt sich hierbei mit einem Gesamtanteil von 30% um die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter in Westeuropa und Nordamerika. (43) Sie stellt eine Erkrankung des höheren Lebensalters dar und tritt somit vor dem 4. Lebensjahrzehnt äußerst selten auf. Ihre Inzidenz steigt vom 50. bis zum 80. Lebensjahr stark an (38) und zeigt ein Überwiegen an männlichen Erkrankten mit einem Verhältnis zwischen Männern und Frauen von ca. 2:1. (43) Die Erkrankung ist durch einen interindividuell höchst variablen klinischen Verlauf gekennzeichnet. Während ein Teil der Patienten einen nur langsam voranschreitenden oder sogar stabilen Krankheitsverlauf zeigt und über viele Jahre keine Therapie benötigt, zeigen andere Patienten eine rasche Progredienz der Erkrankung mit früher Therapiebedürftigkeit und zum Teil rasch letalem Ausgang. (130) Im Zuge des medizinischen Fortschritts wird die CLL heute meist in frühem, asymptomatischem Stadium, anhand einer Analyse des peripheren Blutes diagnostiziert. Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung können Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust sowie Leistungsminderung im Sinne einer B-Symptomatik auftreten. Häufig finden sich Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie und zunehmende Zytopenie mit Anämie und Thrombopenie. Des Weiteren wird der Verlauf kompliziert durch eine zunehmende Infektanfälligkeit mit Auftreten von lebensbedrohlichen Infektionen, Autoimmunphänomenen wie der autoimmunhämolytischen Anämie oder das Auftreten einer hochmalignen Transformation der Erkrankung. („Richter-Syndrom“) In der klinischen Routine finden die Klassifikationen nach Binet (3) und Rai (105), denen vor allem die Abschätzung der Tumorlast zu Grunde liegt, breite Anwendung.

1.2. B-Zell Entwicklung und Somatische Hypermuation

Für die Aufklärung der Ätiologie und der Pathomechanismen der CLL ist der Vorgang der B-Zell-Entwicklung von zentraler Bedeutung. Das Knochenmark, indem ein Großteil der B-Zell-Entwicklung stattfindet, bietet der B-Zell Entwicklung ein unentbehrliches Mikromilieu. Die omnipotente Knochenmarkstammzelle differenziert sich über einen mehrstufigen antigenunabhängigen Prozess mit Durchlaufen der Stadien der Pro-B-Zelle und Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle. Im Pro-B-Zell-Stadium (charakterisiert durch die Marker B 220, sowie CD19 und CD43) (1) findet als erster Schritt der Immunglobulin-Genumlagerung die Verknüpfung von D- und J-Segment (D-J-Verknüpfung) und anschließend die Verknüpfung des V-Segments mit dem D-J-Segment des IgV_H -Gens statt, die das Reifungsstadium der Prä-B-Zelle charakterisiert und sich durch die Expression von $Ig\mu$ im Zytoplasma nachweisen lässt (20, 50, 114, 115). Durch die anschließende Umlagerung des Ig -Leichtkettengens entsteht die unreife B-Zelle, welche komplette Antikörper vom Typ IgM bildet und in ihre Zellmembran integriert. (20) Im Stadium der unreifen B-Zelle kommt es außerdem zur Veränderung der Rezeptorspezifität durch sekundäre Umlagerung des Leichtkettenlokus („Rezeptor editing“) (104, 121) oder zur Eliminierung autoreaktiver B-Zellen durch Apoptose oder Anergisierung des entsprechenden Klons bei weiter bestehender Autoreaktivität. (1) Nicht selbst-reaktive B-Zellen exprimieren nach erfolgtem „alternativem“ Splicing der Ig -Schwerketten-mRNA sowohl IgM als auch IgD , (86) verlassen dann das Knochenmark und besiedeln als reife naive B-Zellen die sekundären lymphatischen Gewebe.

Diese B-Zellen, die von $CD4^+$ T-Helferzellen des lymphatischen Gewebes aktiviert wurden, differenzieren entweder zu kurzlebigen IgM sezernierenden Plasmazellen oder wandern als antigeninduzierte („primed“) B-Zellen in die Primärfollikel, wo sie Keimzentren bilden. (20) Dabei ordnen sie sich in ein dichtes Netzwerk aus follikulären dendritischen Zellen (FDC-Zellen) und entwickeln sich über Zentroblasten zu Zentrozyten. Diese leisten wahrscheinlich einen zentralen Beitrag zu den selektiven Vorgängen, auf denen die immunologische Antikörperantwort beruht (20) und gewährleisten den Fremdantigenkontakt jeder eingewanderten Zelle. Im Verlauf der sogenannten Keimzentrumsreaktion kommt es zuerst zur Affinitätsreifung und danach zum Klassenwechsel („class-switch“) des Immunglobulins. Die Affinitätsreifung erfolgt durch den Mechanismus der somatischen Hypermuation. (59) Dieser noch nicht in allen Einzelheiten verstandene Prozess fügt in die variablen Abschnitte des Immunglobulin-

Schwer- und Leichtkettengens eine hohe Anzahl von Punktmutationen und seltener auch Deletionen und Duplikationen ein (22, 59, 102, 128). Es gibt Hinweise darauf, dass die Einführung von Mutationen über Doppelstrangbrüche als Intermediärprodukt und unter Beteiligung einer fehleranfälligen DNA-Polymerase realisiert wird. (59) Die Mutationsrate wird auf ca. 10^{-3} pro Generation geschätzt und liegt somit etwa 6 Zehnerpotenzen über der Spontanmutationsrate. (2) Ein Teil der Mutationen bewirkt einen Aminosäureaustausch für das betroffene Basentriplet, (sog. „Replacement Mutation“) was zu einer Steigerung oder zu einer Verminderung der Affinität des B-Zellrezeptors gegenüber einem spezifischen Antigen führt oder durch die Einführung von Stop Codons oder Leserahmenverschiebungen die Produktion eines funktionellen Immunglobulins erst gar nicht möglich macht. In Abhängigkeit von der Rezeptoraffinität existieren Rückkopplungsmechanismen, die entweder zur Apoptose der B-Zelle oder zur weiteren Proliferation derjenigen Zellen führen, deren B-Zell-Rezeptoren eine Affinitätssteigerung erfahren haben. (2, 18, 20, 97, 108)

1.3. Vorhersage des Erkrankungsverlaufs/Prognostische Marker bei der CLL

Der ausgesprochen heterogene klinische Verlauf mit stark variierender Prognose macht eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf des einzelnen CLL-Patienten sehr schwierig. Da die Erkrankung mit konventionellen zytostatischen Therpieregimen bislang nicht heilbar ist und oft langsam progredient verläuft, wird nach wie vor ein symptomorientiertes Therapiekonzept verfolgt. Die Entscheidung über den Beginn einer Chemotherapie gründet sich dabei im Wesentlichen auf die Ausprägung von Symptomen des Patienten und das Vorhandensein von Blutbildveränderungen. In neuerer Zeit gibt es Parameter mit prognostischer Relevanz wie die Bestimmung der Thymidinkinase (51) und des Beta₂-Mikroglobulins (29) im Serum, die Lymphozytenverdopplungszeit (94) sowie das Knochenmarksinfiltrationsmuster (111) die Therapieentscheidungen mit beeinflussen könnten. Durch Chromosomen-Bänderungsanalysen ließen sich bei ca. 30-50% der CLL-Patienten chromosomale Aberrationen nachweisen. (44, 61) Durch die Entwicklung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (kurz: „FISH-Methodik“) wurde der sensitivere

Nachweis von Aberrationen in Interphasezellkernen mit Hilfe krankheitsspezifischer Sonden möglich. In 82% aller CLL-Patienten ließen sich so klonale genomische Aberrationen nachweisen. (32, 33) Am häufigsten fanden sich Deletionen von Chromosom 13q, gefolgt von Deletionen an Chromosom 11q, der Trisomie-12q und einer Deletion an Chromosom 17p. Es konnte für die Deletionen-11q und -17p in einer multivariaten Analyse eine unabhängige prognostische Bedeutung gezeigt werden. Dabei zeigen Patienten mit einer 17p-Deletion ein geschätztes medianes Überleben von 32 Monaten, jene mit einer 11q-Deletion von 79 Monaten wohingegen Patienten mit einer 13q-Deletion als einzige chromosomale Aberration sogar eine günstigere Prognose aufwiesen als CLL-Patienten mit normalem Karyotyp. (geschätzte mediane Überlebenszeit: 133 Monate) (31, 32, 33, 116) Weiterhin ist das Vorliegen einer 17p-Deletion mit einem schlechteren Ansprechen der Erkrankung auf eine zytostatische Therapie assoziiert. (30, 34, 42) Über den molekulargenetischen Hintergrund der chromosomalen Aberrationen bei der CLL ist wenig bekannt. Mehrere Arbeiten zeigen eine Rolle des p53-Tumorsuppressorgens in der Pathogenese der CLL, das im Falle der 17p-Deletion betroffen ist. (30, 34, 42) Darüberhinaus konnte bei einigen Patienten mit 11q-Deletion eine Mutation im ATM-Gen (Ataxia Teleangiectasia Mutated-Gen) gezeigt werden. (112)

Um eine nähere Charakterisierung der Tumorzellen an Hand ihres Reifungsstadiums durchführen zu können wurde der variable Anteil des rearrangierten Immunglobulin-Schwerkettengens (IgV_H) auf das Vorhandensein somatischer Mutationen untersucht, die durch den Vorgang der somatischen Hypermutation im Zuge der B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum erworben werden. Diese Analysen der IgV_H-Gene bei der CLL haben gezeigt, dass sich die Erkrankung aus 2 Subgruppen zusammensetzt. Während die CLL-Zellen bei einem Teil der Patienten unmutierte V_H-Gene tragen, finden sich bei dem anderen Teil der Fälle somatisch hypermutierte V_H-Gene. (23, 39, 52, 100) Da die CLL früher als eine von naiven B-Zellen ausgehende Erkrankung angesehen wurde, warf die Entdeckung von mutierten V_H-Genen die Frage auf, ob die beiden Untergruppen sich von unterschiedlichen Vorläuferzellen, beispielsweise Prä- und Post-Keimzentrumzellen, ableiten könnten. Neue Genexpressionsanalysen jedoch konnten zeigen, dass beiden Subgruppen ein Expressionsmuster gemeinsam ist, das jenem von Memory-B-Zellen (Gedächtnis-B-Zellen) ähnelt. (67, 110) Untersuchungen des Oberflächenmarkerprofils erwiesen, dass der Phänotyp von CLL-Zellen jenem von aktivierten, antigenerfahrenen Lymphozyten ähnelt. (24) Ebenso konnte der V_H-Gen-Mutationsstatus als einer der aussagekräftigsten prognostischen Marker bei der CLL, mit signifikant kürzerem

Überleben in der Gruppe mit unmutierten V_H -Genen, identifiziert werden. (23, 52, 73, 101) Weiterführende Untersuchungen der V_H -Gen-Rearrangements führten zu der Erkenntnis, dass bestimmte V_H -Gene, wie beispielsweise das V_{H1-69} -Gen, das V_{H3-07} -Gen oder das V_{H4-34} -Gen bei der CLL bevorzugt umgelagert werden. (39, 52, 60, 109, 124) Bereits vor längerer Zeit lies sich zeigen, dass ein Großteil von V_{H1-69} -Gen-Rearrangements bei CLL-Patienten charakteristische Merkmale gemeinsam haben, wie das Fehlen von Mutationen, eine lange CDR3-Region und eine bevorzugte Umlagerung bestimmter D- und J_H -Gene im Vergleich mit normalen B-Zellen. (39, 60, 65, 109, 113). Kürzlich konnten mehrere CLL-Subgruppen, die bestimmte V_H -Gene nutzen, mit homologen CDR-3-Regionen charakterisiert werden, die auch eine beschränkte Nutzung der variablen Immunoglobulin-Leichtkette zeigen. (91, 124, 126) Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme dass Mechanismen der Antigenselektion eine Bedeutung in der Pathogenese der CLL haben könnten, (46, 91, 124) indem Fremdantigene oder Autoantigene die Proliferation von B-Zellen unter Mitwirkung des B-Zell-Rezeptors stimulieren und somit das Risiko einer malignen Transformation durch Hinzugewinn von genetischen Läsionen während der klonalen Expansion erhöhen könnten. (15) Auch die bevorzugte Umlagerung des V_{H3-21} -Gens bei CLL-Patienten wurde bereits beschrieben. (122) Interessanterweise ließen sich für viele der V_H -mutierten als auch der V_H -unmutierten V_{H3-21} -CLL-Patienten Rearrangements mit sehr kurzen (7 Codons) und homologen CDR3-Regionen der schweren Immunglobulinkette (HCDR3-Regionen) sowie eine vorwiegende Lambda-Leichtkettenexpression (90%) mit bevorzugter $V_{\lambda 2-14}$ -Umlagerung nachweisen. Dies spricht für ein gemeinsames Antigenepitop, das von dem V_{H3-21} -umlagernden Tumor erkannt wird. Darüberhinaus zeigten Patienten, deren CLL eine V_{H3-21} -Umlagerung aufwies, ein kürzeres, mit dem von V_H -unmutierten Patienten vergleichbares, Gesamtüberleben trotz der Tatsache, dass $\frac{2}{3}$ der CLL-Fälle dieser Subgruppe mutierte V_H -Gene aufwiesen. (123) Aus diesem Grund gibt es Bestrebungen die V_{H3-21} -CLL-Patientengruppe hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung als eigene, vom Mutationsstatus unabhängige Entität, zu betrachten. Diese Erkenntnis wird weiter gestützt durch das Vorliegen eines spezifischen Genexpressionsmusters, verglichen mit V_H -mutierten und V_H -unmutierten CLL-Fällen, das kürzlich für die V_{H3-21} -CLL-Fälle gezeigt werden konnte. (37) Während die Häufigkeit von V_{H1-69} -Gen-Rearrangements bei der CLL in verschiedenen Teilen der Welt gleich erscheint, wurde die Anzahl der V_{H3-21} -CLL-Fälle in Schweden und Großbritannien höher angegeben (85, 90, 122, 123) als bei CLL-Patienten anderer Länder. (39, 52, 87, 92) Dieser Umstand führte zu der Frage, ob es

sich beim Auftreten von V_{H3-21} -Rearrangements um ein regional begrenztes Phänomen handelt. Eine kürzlich durchgeführte Studie an V_{H3-21} -CLL-Fällen aus verschiedenen Mittelmeer-Ländern konnte, wenn auch in geringerer Häufigkeit verglichen mit entsprechenden Vorarbeiten, identische Rearrangements nachweisen. (45) In dieser Arbeit war eine homologe CDR3-Region mit einer schlechteren Prognose assoziiert als bei Patienten mit nicht homologer HCDR3.

Ein weiterer biologischer und möglicherweise prognostisch relevanter Marker bei der CLL ist die Expression des CD38-Oberflächenantigens, welches unter anderem das Aktivitätsstadium der B-Zelle widerspiegelt. (41) So wird eine hohe CD38-Expression mit ungünstiger, eine niedrige Expression hingegen mit günstiger Prognose assoziiert. (27, 53, 58, 88) Die Bedeutung der CD38-Expression als Surrogatmarker für den IgV_H -Mutationsstatus sowie die Höhe des Prozentsatzes an CD38-exprimierenden Zellen, ab der von einer $CD38^+$ -Zellpopulation gesprochen werden kann, wird kontrovers diskutiert. (23, 53, 58, 73, 120) Im Rahmen, der in jüngerer Zeit durchgeführten Genexpressions-Analysen bei der CLL ließen sich einige Gene identifizieren, die in den Gruppen mit mutierten und den mit unmutierten V_H -Genen unterschiedlich exprimiert werden. (67, 110) Darunter zeigte neben ca. 30 weiteren Proteinen, das Zeta-associated-protein-70 (ZAP-70), ein Protein der Tyrosinkinase-Familie welches von T-Zellen und NK-Zellen, nicht aber von normalen B-Zellen, exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Initiierung von T-Zell-Signalwegen zu haben scheint, eine um den Faktor 5 höhere Expressionsrate in der V_H -unmutierten Gruppe und erwies sich als bester Diskriminator zwischen beiden Subgruppen (127). In mehreren jüngeren Arbeiten wurde des Weiteren eine Rolle von ZAP-70 als unabhängiger prognostischer Faktor bei der CLL beschrieben. (21, 99, 106, 127) Die Bedeutung von ZAP-70 als Surrogatmarker des IgV_H -Mutationsstatus (ZAP-70⁺/ V_H -unmutiert bzw. ZAP-70/ V_H -mutiert) oder als unabhängiger prognostischer Marker bei der CLL sowie die Bedeutung von, bezüglich ZAP-70-Expression und V_H -Mutationsstatus, diskordanten Fällen ist derzeit nicht abschließend geklärt. In einer jüngst veröffentlichten Arbeit konnte nach multivariaten Analysen unter Einbeziehung von ZAP-70 und chromosomalen Aberrationen ein Risikomodell erstellt werden, das auch ohne Kenntnis des V_H -Mutationsstatus eine zuverlässige prognostische Abschätzung bei CLL-Patienten erlaubt. (75)

1.4. Struktur des Immunglobulin-Schwerketten-Locus (I_H-Locus)/ Mechanismus des VDJ-Rearrangements/ Hierarchischer Mechanismus der Leichtkettenexpression

Der Mechanismus des VDJ-Rearrangements stellt einen essentiellen Prozess der B-Zell Entwicklung dar, der durch Kombination einzelner Segmente aus einer begrenzten Anzahl von Gensegmenten ein vielfältiges Antigenrezeptorrepertoire herstellt. Diese Vielfalt an Antikörpern ist nötig um die verschiedensten aus der Umwelt eindringenden Antigene erkennen und beseitigen zu können (59)

1.4.1. Struktur der Immunglobuline:

Die variablen Regionen von Antikörpern setzen sich aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Untereinheiten zusammen. (125) Die variable Region (V-Region) bestimmt die Antigenpezifität des Immunglobulins, während die konstante Region (C-Region) für die Effektoreigenschaften des jeweiligen Antikörpers verantwortlich ist. Das Gen für den variablen Teil des Antikörpers wird in unterschiedliche Strukturbestandteile unterteilt. Zum einen die sog. „Framework Regions“ (FRs), die für strukturelle Stabilität der Antigenbindungsstelle verantwortlich sind und die dreidimensionale Faltstruktur des Antikörpers aufrechterhalten, sowie zum anderen die „Complementary Determining Regions“ (CDRs), die die hypervariablen Regionen bilden, eine extrem hohe Affinität zum Antigen besitzen und am meisten zur Variation zwischen den Antikörpern beitragen. Dabei sind jeweils vier FR-Regionen im Wechsel mit 3 CDR-Regionen innerhalb des VDJ- bzw. VJ-Rearrangements nacheinander aufgereiht. Der Genlocus für die schweren Immunglobulin Ketten besteht aus einem ca. 1100kb langen DNA-Abschnitt auf Chromosom 14q32.3. Dort sind perlschnurartig Gensegmente für die drei verschiedenen Anteile der schweren Kette aneinandergereiht: V_H-Segmente (variable heavy chain), D_H-Segmente (diversity heavy chain) und J_H-Segmente (joining heavy chain) (105) Insgesamt sind bislang 119 potentielle V_H-Keimbahngene bekannt, die sich in sieben V_H-Familien mit Homologien von 80% untereinander einteilen lassen. Nur bei 51 dieser 119 V_H-Gensegmente konnte bislang ein Rearrangement in vivo nachgewiesen werden. Sie verfügen über einen offenen Leserahmen ohne Stopkodons und sind somit potentiell produktiv. (18, 89) Darüberhinaus sind etwa 30 D_H-Segmente und 12 J_H-Segmente identifiziert. Beide werden ebenfalls aufgrund von Strukturähnlichkeiten in jeweils sechs

Familien eingeteilt. (18, 19, 89) Auf den Chromosomen 15q11.2 sowie 16p11 sind weitere 24 V_H - und einige J_H -Segmente gefunden worden, deren Umlagerung in vivo jedoch nicht beobachtet wurde und die am ehesten Duplikationen entsprechen. (18, 89)

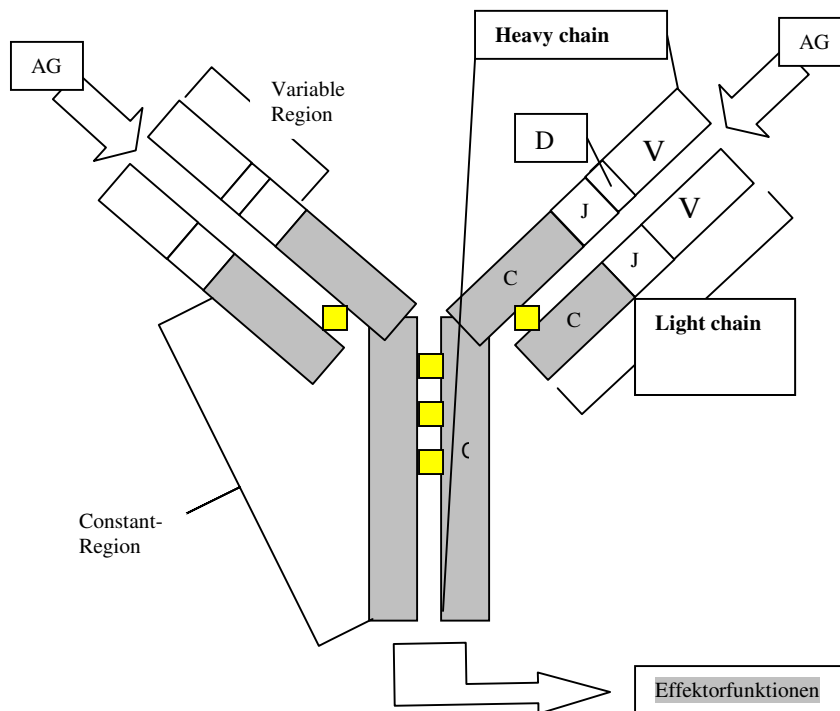


Abb.1: Schematische Struktur des Antikörpermoleküls/Immunglobulins mit Heavy chain = schwere Kette und Light chain = leichte Kette, sowie variablem und konstantem Anteil: AG: Antigenbindungsstelle. V: Variable Region. D: Diversity Region. J: Joining Region. C: Constant region /konstante Region

1.4.2. Mechanismus des VDJ-Rearrangements:

Grundlage für den Prozess des VDJ-Rearrangements bildet die bereits beschriebene besondere Organisation des Immunglobulin-Schwerkettenlokus auf Chromosom 14. Aus der Vielzahl der auf Chromosom 14q32.3 gelegenen Gensegmente wird zunächst eines der D-Segmente mit einem der J_H -Segmente verbunden und in einem zweiten Schritt ein V_H -Segment an das bestehende DJ_H -Segment angefügt, wodurch das VDJ-Rearrangement entsteht. Dabei werden geleitet durch spezielle Signalsequenzen (RSS = Recombination Signal Sequence) enzymatisch Doppelstrangbrüche eingeführt, die die DNA zwischen den Schnittenden deletiert und an den Schnittenden wieder verbindet. (1, 18, 114)

Um die Effizienz und Spezifität jeder B-Zelle für nur ein Antigen zu gewährleisten, wird in der Regel nur 1 Allel des Ig_H - und Ig_L -Locus rearrangiert. Das zweite Allel ist entweder nicht produktiv umgelagert oder wird nur bis zum Stadium der DJ-Verknüpfung

rearrangiert. Dieses Phänomen wird als „allelic exclusion“ bezeichnet. Die so entstandene kombinatorische Vielfalt wird durch die Deletion von Nukleotiden durch Exonukleasen und das zusätzliche Einfügen von Nukleotiden im Bereich der V_H - D_H - bzw. D_H - J_H -Verbindungsstellen durch das Enzym TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) weiter erhöht. Dadurch wird ein individueller DNA-Abschnitt (V_H -N-D-N'- J_H , bzw. V_L -N- J_L) gebildet, der als „molekularer Fingerabdruck“ der jeweiligen B-Zelle interpretiert werden kann. Entstehen im Rahmen des Prozesses Stop-Codons oder Verschiebungen des offenen Leserahmens der D-Segmente kann kein funktionales Ig-Protein gebildet werden und im Falle einer ebenfalls fehlerhaften zweiten unabhängigen Umlagerung wird die B-Zelle durch Apoptose eliminiert.

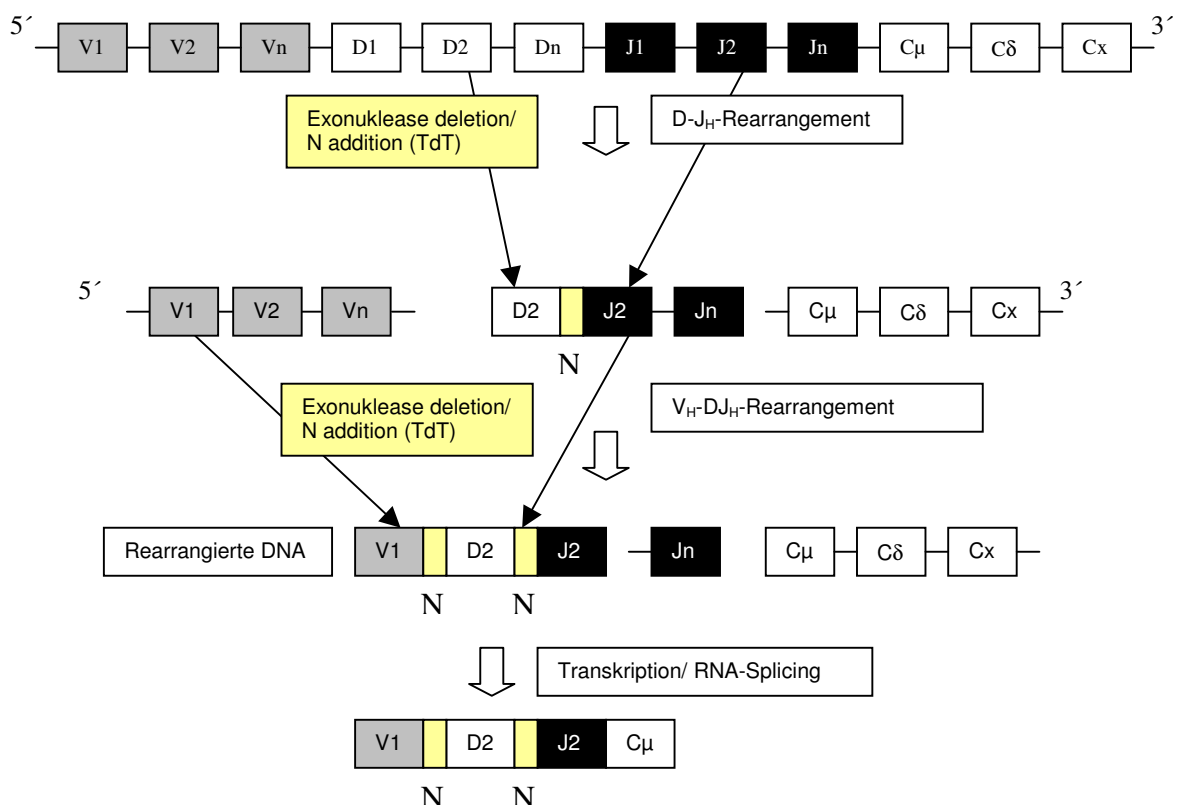


Abb. 2: Schematische Darstellung des VDJ-Rearrangement-Prinzips: V: Variable Region. D: Diversity Region. J: Joining Region. DNA: Desoxyribonukleinsäure. VDJ: Kombinationssequenz aus Variable Region, Diversity Region und Joining Region. C: Constant Region. TdT: Terminal desoxynucleotidyl transferase. N: individueller DNA-Abschnitt erstellt durch die TdT-Aktivität. D - J_H -Rearrangement: Kombinationssequenz aus Diversity- und Joining heavy chain/Diversity- und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. V_H - DJ_H -Rearrangement: Kombinationssequenz aus Variable-, Diversity- und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. Die Bezeichnungen $V1/2/n$, $D1/27n$ bzw. $C\mu/\delta/x$ stehen jeweils für unterschiedliche Variable-, Diversity- und Constant Regionen. 5' bzw. 3' bezeichnen die jeweiligen Enden des DNA-Stranges.

1.4.3. Hierarchischer Mechanismus der Leichtkettenexpression:

Etwa 60% der normalen B-Zellen exprimieren Kappa-Leichtketten (κ -Leichtketten), während die restlichen Lambda-Leichtketten (λ -Leichtketten) exprimieren. (72) Eine vergleichbare Verteilung wurde auch bei CLL-Zellen gefunden. Nach dem Rekombinationsmodell beginnt die Umlagerung des Immunoglobulin-Leichtketten (Ig_L) Locus mit dem V_κ -Locus. (57) Ist das erste V_κ -Gen-Rearrangement nicht-funktionell kann es durch die Umlagerung des sog. Kappa-deletierenden-Elements (Kappa-Deleting-Element/KDE), das sich am 3' Ende des J_κ -Gens befindet deletiert werden. Dieser Prozess kann einerseits durch eine Umlagerung zwischen dem KDE und einer Rekombinations-Signal-Sequenz (RSS) eines V_κ -Gens erfolgen, was zu einer Deletion des gesamten V_κ -Rearrangements führt, oder durch Umlagerung des KDE an eine J_κ - C_κ -Intron-RSS-Region, wodurch das V_κ -Gen-Rearrangement inkomplett umgelagert und somit nicht-funktionell wird. (siehe Abb.3) (49, 68, 117, 118) Wenn die Umlagerung beider Rearrangements nicht zu einer funktionellen Leichtkette führt, wird die Umlagerung des λ -Allels vorangetrieben (57, 66, 71) Eine Umlagerung des Immunoglobulin- λ -Locus ist bei B-Zellen mit einem Keimbahn-Ig- κ -Locus gelegentlich beschrieben, was die Frage aufwirft ob das V_κ -Gen-Rearrangement unter Einbeziehung des KDE möglicherweise nicht zwingend erforderlich ist für die Einleitung der V_λ -Gen Rekombination. (16, 17) Da ein Großteil der V_H3 -21-Fälle eine klonale λ -Leichtkettenexpression mit einer überwiegenden Präferenz für ein bestimmtes V_L -Gen zeigt, führt dieser Sachverhalt zu der Frage ob die Umlagerung des Ig_L -Locus auch bei den V_H3 -21-CLL-Fällen auf das beschriebene abgestufte hierarchische Rekombinationsmodell zurückzuführen ist.

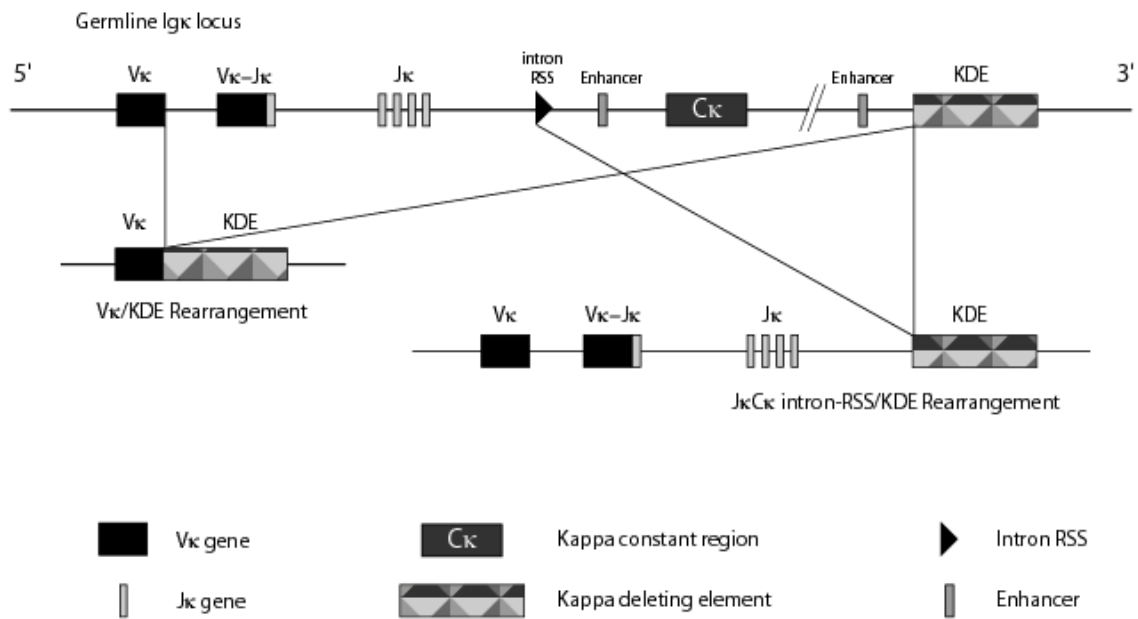


Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher Rearrangements unter Einbeziehung des Kappa-Deleting-Elements (KDE): Das Gen für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins (V_κ-Gen) kann durch 2 mögliche alternative Umlagerungen des Kappa-Deleting-Elements (KDE) inaktiviert werden. Es kann entweder umgelagert werden a) an eine Recombination Signal Sequence (RSS), die sich in unmittelbarer Nähe der V_κ-Gen-Region befindet, wodurch das gesamte V_κ-Gen einschliesslich der Schnittstelle von Variable Region und Joining Region der Kappa-Leichtkette (V_κJ_κ-Joining-Region) und die Constant-Region der Kappa-Leichtkette (C_κ) deletiert wird. Die resultierende Sequenz wird als sogenanntes V_κKappa-Deleting-Element-Rearrangement (**Kurz: V_κKDE-Rearrangement**) bezeichnet oder b) an eine Intron-Recombination Signal Sequenz (Intron-RSS), wodurch die C_κ-Region deletiert wird. Diese umgelagerte Sequenz wird als sogenanntes J_κ-C_κ-Intron-RSS-Kappa-Deleting-Element-Rearrangement (**Kurz: J_κ-C_κ-Intron-RSS-KDE-Rearrangement.**) bezeichnet.

In der ersten Zeile dargestellt der Keimbahn-Locus der Kappa-Leichtkette (κ-Leichtkette) des Immunglobulins (germline Ig_κ), darunter die beiden alternativen Kappa-Deleting-Element-Rearrangements (KDE-Rearrangements). **Links dargestellt das V_κKDE-Rearrangement. Rechts dargestellt das J_κ-C_κ-Intron-RSS-KDE-Rearrangement.** 5' bzw. 3' bezeichnen die jeweiligen Enden des DNA-Stranges. Enhancer: Transkriptionsverstärkende Sequenz. V_κ: Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. J_κ: Joining Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. V_κJ_κ: Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region der Kappa-Leichtkette.

1.5. Fragestellungen der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte unter Einbeziehung der eigenen und weiterer Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen des europäischen und nicht-europäischen Auslands untersucht werden, ob bei CLL-Patienten mit Umlagerung des V_{H3-21} -Gens (V_{H3-21} -CLLs) Ähnlichkeiten in der molekularen Struktur des V_H/V_L -Gen-Rearrangements, unabhängig von deren geographischer Herkunft vorliegen. Des Weiteren sollte an einer sehr großen Sammlung von V_{H3-21} -Fällen aus Schweden, Deutschland, Italien, USA, Finnland und Australien durch Korrelation mit klinischen Daten die prognostische Bedeutung der V_{H3-21} -Umlagerung ermittelt und durch Korrelation mit dem V_H -Mutationsstatus darüber hinaus die unabhängige prognostische Bedeutung des V_{H3-21} -Gens bei der CLL ermittelt werden. An einem Teil der analysierten Patienten sollte die Bedeutung der bei der CLL relevanten prognostischen Faktoren CD38-Expression, ZAP-70-Expression und der chromosomalen Aberrationen Deletion-17p und Deletion-11q innerhalb des V_{H3-21} -Kollektivs untersucht werden. Aus der genaueren Analyse der V_H - und V_L -Struktur und insbesondere der CDR3-Region, die somit die Charakterisierung des B-Zell-Rezeptors erlauben, sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung dieses B-Zell-Rezeptors in der Pathogenese der CLL gewonnen werden. In einem weiteren Schritt sollte der Mechanismus der Umlagerung der Immunglobulin-Leichtkette untersucht werden. Mit Hilfe der Ermittlung des KDE-Rearrangement-Status bei V_{H3-21} -Fällen mit Expression einer V_λ -Leichtkette sollte eine Aussage über die Reihenfolge der Leichtkettenumlagerung bei CLL-Patienten gewonnen werden und untersucht werden, ob Unterschiede zum Mechanismus der Leichtkettenumlagerung bei normalen B-Zellen bestehen.

- Becton Dickinson (BD Bioscience) Einwegspritze 5ml
Erembodegem-Aalst, Belgien Kanüle 0,7mm x 30mm
Kanüle 0,7mm x 30mm
Optilux Petrischalen 100x15mm
Falcon Tubes 50ml/ 15ml
SnapCaps 14ml
Perfusorspritze
Yeast
Trypton
FACScan Durchflußzytometer
Antikörper CD5 FITC/Klon L17F12
Antikörper CD19 PerCP Cy 5.5/Klon SJ25C1
Antikörper CD38 PE/Klon HB-7
- BD Bioscience, Heidelberg Antikörper CD3-PE/ Klon SK7
Antikörper CD56-PE/Klon My 31
- Biochrom, Berlin FCS
RPMI 1640 Medium (1x)
L-Glutamin
Penicillin
Streptomycin
- Biomol, Hamburg Antikörper ZAP-70, Klon 2F3.2
- BioRad, Hercules, CA, USA 40% Acrylamide/Bis Solution 40:1
Urea
10x TBE Extended Range Buffer
Temed
- Corning Inc, Corning, NY, USA Thermowell 96Well PCR Plate 200µl
- Dako, Hamburg Antikörper Goat-Antimouse-FITC
- Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436
8-Kanal Pipette
Zentrifuge 5415
Reaktionsgefäße 1,5ml/2ml
Rnase Inhibitor

- EuroBio, Les Ulis, Frankreich Ethidiumbromid
- Fluka, Bachs, Schweiz Chloroform
- GibcoBRL, Eggenstein 1kb-DNA Ladder
BlueJuice-Gel-Loading-Buffer
PBS
- Heraeus, Hanau Heraeus Biofuge Pico
Brutschrank
Heraeus Minifuge T
Biofuge Fresco
- Heidolph Reax 2000 Vortexer
- Invitrogen, Groningen, Niederlande TOPO TA Kloning Kit
- Invitrogen Corp., Carlsbad California, USA Moloney murine leukemia virus reverse
Transkriptase
- Invitrogen Paisley, UK Platinum[®]Taq
10x PCR Rxn Buffer
- J. T. Baker, Deventer, Niederlande NaCl
- Kimberley-Clark Kimwipes light
- Klöhn, Las Vegas, USA 8-Kanalpipette
- Köttermann Labortechnik, Vetze-Hünsingen Wasserbad
- LMS Labortechnik, Rosenheim Gelkammer
- Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande Natriumcitrat
- Merck, Darmstadt Isopropanol
DMSO
- Nalgene Nunc Intl, Rochester, NY, USA Sterilfilter

- Neuberger, Freiburg Vakuumpumpe
- New Brunswick Scientific, Rüttler
Edison, NJ, USA
- Ortho-Clinical Diagnostics, BSA
Neckargmünd
- peqlab Biotechnologie Gmbh, peqGold TriFast
Erlangen
- Pharma Biotech LKB Biochrom, Photometer Ultrospec III
England
- Qiagen, Hilden 10x PCR-Puffer
HotStar Taq Polymerase
Qiaprep 8 Mini Kit
Vacuumkammer QIAvac 6s
QIAquick 8 PCR Purification Kit
DyeEx 96 Kit
- Roche, Mannheim Desoxyribonucleotide Triphosphate
Set PCR Grade
Kanamycin
H₂Od
- Savant, Framingdale, NY, USA Vacuumzentrifuge
- Sigma Aldrich, Steinheim Bacteriological Agar
Ethanol 100%
Agarose
Ammoniumpersulfat
- Stratagene, La Jolla, CA, USA Eagle Eye II

2.1.3. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

- LB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Yeast
10 g	NaCl
ad 1000 ml	H ₂ O

- Polyacrylamidgel 4,5%

45 ml	40% Acrylamide/Bis
	Solution 40:1
40 ml	10x TBE
144 g	Harnstoff
200 ml	H ₂ O

- TAE 50x Stammlösung

242 g	Trisbase
57,1 ml	Eisessig
100 ml	EDTA 0,5 M., pH 8,0
ad 1000 ml	H ₂ O

2.2. DNA-Präparation

2.2.1 DNA/RNA-Gewinnung

Als Ausgangsmaterial der DNA-Präparation dienen Zellpellets mit einem Zellgehalt von 1×10^7 - 2×10^7 Zellen. Die mononukleären Zellen werden durch Ficoll Dichtegradient-Zentrifugation aus Vollblut extrahiert und bei -20°C asserviert. Die eigentliche Präparation der DNA wird mit Hilfe des peqGold TriFast-Systems[®] (peqlab Biotechnologie) nach dem angegebenen Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts der Probe wird die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Abschließend werden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 200 ng/μl erstellt und um die DNA auf Ihren Degradationszustand zu prüfen eine Agarosegel-Elektrophorese (näher erläutert in 2.3.5.) durchgeführt.

2.2.2 cDNA-Herstellung

1 µg RNA wird in cDNA revers-transkribiert mittels 200 Einheiten der Moloney murine leukemia virus reversen Transkriptase (Invitrogen Corp, Carlsbad, California, USA) 1 Einheit des Rnase Inhibitors (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 20 pmol des Oligo dT Primers. Die Reagenzien werden bei 42°C für 1 Stunde inkubiert, für 10 Minuten auf 65°C erhitzt um die Reaktion zu beenden und anschliessend auf das Endvolumen von 100 µl verdünnt.

2.3. DNA-Amplifikation der VDJ-Schwerkette mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.1 Reaktionsprinzip

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe spezifische DNA-Abschnitte in vitro für weiterführende Analysen amplifiziert werden können. Das Prinzip der PCR beruht auf einem dreiteiligen Reaktionszyklus unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*. Der Reaktionszyklus beginnt mit der Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei 95°C. Um die spezifischen Oligonukleotide mit der DNA zu hybridisieren (Annealing) wird die Temperatur in einem zweiten Schritt auf 65°C abgesenkt. Die Oligonukleotide sind so gewählt, daß sie sich jeweils komplementär zum 5'-bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts verhalten. Durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide kann so ein bestimmter DNA-Abschnitt bekannter Sequenz amplifiziert werden. Diese Oligonukleotide dienen als Primer der thermostabilen DNA-Polymerase, (HotStarTaq[®], Fa. Qiagen) welche durch Anheben der Temperatur in Schritt 3 der PCR auf 72°C optimale Reaktionsbedingungen zur Synthese des jeweils komplementären DNA-Strangs vorfindet. (Elongation) Nachdem alle Reaktionszyklen durchlaufen sind, wird ein abschließender Extension-Schritt von 10 Minuten bei 72°C angeschlossen. Die zur Synthese der DNA-Abschnitte nötigen Desoxyribonukleotidtriphosphate werden bei Reaktionsbeginn in äquimolarem Verhältnis zugesetzt.

2.3.2. Oligonukleotid-Struktur

Da bei den VDJ-Rearrangements der Immunglobuline verschiedene V_H -Familien existieren, werden zur Amplifikation des VDJ-Rearrangements 6 familienspezifische 5'- V_H -Primer verwendet. Die 5'- V_H Primer binden in der Framework I Region des V_H -Gens. Für die nachfolgenden GeneScan-Analysen werden die Primer mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Primer der Familien V_{H1} , V_{H3} , V_{H4} bzw. V_{H2} , V_{H5} , V_{H6} werden dabei jeweils mit drei unterschiedlichen Farbstoffen (FAM, TET und HEX) markiert. Als 3'-Primer werden Oligonukleotide verwendet, die in der Joining Region (J_H -Region) des VDJ-Rearrangements binden. Da auch hier mehrere J_H -Familien existieren, müssen mehrere verschiedene J_H -Primer eingesetzt werden: Ein Primer für J_{H3} , ein Primer für J_{H6} und ein Konsensus Primer, der an die Familien J_{H1} , 2, 4 und 5 wegen deren großer Übereinstimmung gleichermaßen spezifisch bindet, werden verwendet. Da durch den Einsatz der V_H -Framework-Primer die ersten Codons der FR1-Region des V_H -Gens nicht amplifiziert werden können, können alternativ familienspezifische 5'- V_H -Leader-Region-Primer eingesetzt werden, die es erlauben das gesamte V_H -Gen zu amplifizieren. Diese liefern jedoch nicht in allen Fällen ein verwertbares Amplifikat, weshalb sowohl Framework- als auch Leader-Region-Primer zum Einsatz kommen. (79) In 9 Fällen wurde das V_H -Gen-Rearrangement mittels Framework-Region 2 Primern und entsprechenden J_H -Consensus Primern amplifiziert. (28)

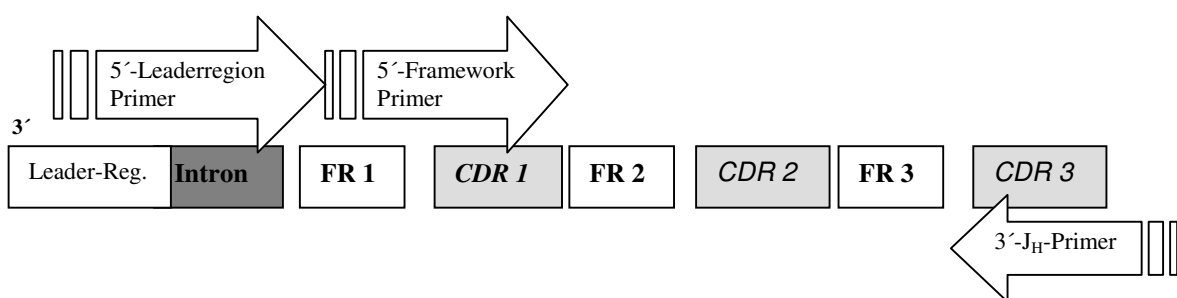


Abbildung 4: Angriffsort der Framework-Primer der variablen Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H -Framework-Primer) und Leader-Region-Primer: Veranschaulichung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction/PCR). Schematisch dargestellt ist das rearrangierte Immunglobulin-Schwerkettengen. FR: Framework Region 1-3. CDR: Complementary Determining Region 1-3. Leader-Reg.: Leader-Region. Als Pfeile dargestellt die Primer mit Angriffspunkt am 3'- bzw. 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz.

Die verwendeten Oligonukleotide werden von der Firma Biospring in lyophilisierter Form bezogen und für die PCR mit H₂O auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

2.3.2.1.a Sequenzen der 5'-V_H-Framework 1 Primer (79):

- V_H1/7: 5'-FAM-CCTCAGTGAAGGTYTCCTGCAAGGC
- V_H2: 5'-FAM-GTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACA
- V_H3: 5'-TET-GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG
- V_H4: 5'-HEX-GACCCTGTCCCTCACCTGCRCTGTC
- V_H5: 5'-HEX-AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGARGA
- V_H6: 5'-TET-ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG

2.3.2.1.b Sequenzen der 5'-V_H-Framework 2 Primer (28):

- V_HFR2.1: 5'-TGGGTGCGACAGGCCCTGG
- V_HFR2.2: 5'-TGGATCCGTCAGCCCCCAGG
- V_HFR2.3: 5'-TGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
- V_HFR2.4: 5'-TGG RTCCGSCAGCCCCCAGG
- V_HFR2.5: 5'-TGGGTGCGCCAGATGCCCGG
- V_HFR2.6: 5'-TGGATCAGGCAGTCCCCATCG

2.3.2.2. Sequenzen der 3'-J_H-Primer (79)

- J_H1,2,4,5: 5'-GGTGACCAGGGTBCCYTGGCC
- J_H3: 5'-AGTGACCAGGGTGCCACGGCC
- J_H6: 5'-GGTGACCGTGGTCCCTTGCC

2.3.2.3. Sequenzen der 5'-V_H-Leaderregion Primer (8, 39):

- V_HL1: 5'-ATGGA CTGGACCTGGAGG
- V_HL2: 5'-CACRCTCCTGCTGCTGACCA
- V_HL3a: 5'-GCTGGGTTTTTCCTTGTTGC
- V_HL3b: 5'-ATGGAGTTKGRCTGAGCTG
- V_HL4-1dr: 5'-ATGAAACACCTGTGGTTCTT
- V_HL5: 5'-CTCCTCCTGGCTGTTCTCC
- V_HL6: 5'-CTGTCTCCTTCCTCATCTTCC

2.3.3. Durchführung der PCR zur Amplifikation des VDJ-Rearrangements (Multiplex-PCR der fluoreszenzmarkierten Framework-Primer)

2.3.3.1. Multiplex-PCR zur Amplifikation des VDJ-Rearrangements mit fluoreszenzmarkierten Framework-Primern

Pro Patient müssen 2 PCR-Reaktionsansätze hergestellt werden. Dabei enthält jeder Reaktionsansatz dNTP's, 10x PCR Puffer, HotStarTaq® DNA-Polymerase und H₂O sowie einen äquimolaren Mix aus den Primern J_H3, J_H6 und J_H1,2,4,5 (3'-J_H-Mix) in einer Konzentration von 10 µM. Zusätzlich enthält der erste Ansatz einen äquimolaren Primer-Mix der V_H Familien 1, 3 und 4 während der zweite Ansatz einen äquimolaren Primer-Mix der V_H Familien 2, 5 und 6 enthält. Diese V_H-Primer binden in der Framework Region 1 und sind mit für jede der 3 V_H-Familien unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Mit Hilfe des GeneScan® Systems, das den an ein PCR-Produkt gebundenen spezifischen Farbstoff detektiert (Kapazität: Detektion von 3 Farbstoffen: HEX, TET, FAM) wird die spezifische V_H-Familie des jeweiligen Patienten ermittelt. So kann die Zahl der Reaktionsansätze, die zur Sequenzierung des VDJ-Rearrangements eines Patienten mit unbekannter V_H-Familie nötig ist, von 6 auf 2 pro Patient gesenkt werden. Um Kontaminationen der Reaktionsansätze mit DNA auszuschließen, werden Negativkontrollen mitgeführt. Die Patienten-DNA wird in einer Menge von 400 ng jeweils zum Reaktionsansatz hinzupipettiert. (Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz von 50 µl.)

Tabelle 1: Pipettierschema der V_H-Framework PCR. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. DNA: Desoxyribonukleinsäure. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. H₂O_d: destilliertes Wasser. µl: Mikroliter. µM: Mikromolar. ng/µl: Nanogramm/Mikroliter. V_H 1,3,4 bzw. 2,5,6-Mix: Mix der Primer 1,3 und 4 bzw. 2,5 und 6 mit Angriffspunkt in der Variablen Region der Immunglobulin-Schwerkette. 3'J_H-Mix: Mix der Primer mit Angriffspunkt in der Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette am 3'-Ende. ng/µl: Nanogramm/Mikroliter. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase.

	V _H -Familien 1,3,4	V _H -Familien 2,5,6	Negativkontrolle V _H 1,3,4	Negativkontrolle V _H 2,5,6
dNTP's [25 µM]	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
10x PCR-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
V _H 1,3,4-Mix [10 µM]	1 µl	-	1 µl	-
V _H 2,5,6-Mix [10 µM]	-	1 µl	-	1 µl
3'J _H -Mix [10 µM]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
H ₂ O _d	40,25 µl	40,25 µl	42,25 µl	42,25 µl
Template [200 ng/µl]	2 µl	2 µl	-	-

Die hitzestabile HotStarTaq[®]-Polymerase benötigt einen Aktivierungsschritt von 15 Minuten bei 95°C, der dem Reaktionszyklus vorgeschaltet ist.

Tabelle 2: PCR-Protokoll der V_H-Framework PCR. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. Min.: Minuten. Sek.: Sekunden

95°C	15 Min.	Aktivierung
95°C	45 Sek.	35 Zyklen
65°C	1 Min.	
72°C	1 Min. 30 Sek.	
72°C	10 Min.	Extension
4°C	unbegrenzt	Lagerung

2.3.3.2. PCR zur Amplifikation des VDJ-Rearrangements mit Leader-Region-Primern

Zur Analyse des kompletten V_H-Gens wird das VDJ-Rearrangement des jeweiligen Patienten unter Verwendung von 5'-V_H-Leader-Region-Primern verifiziert. Da die vom Patienten umgelagerte V_H-Familie durch den GeneScan[®] identifiziert ist, kann der familienspezifische 5'-V_H-Leader Region Primer zusammen mit den 3'-J_H-Primer als „3'-J_H-Mix“ eingesetzt werden.

Tabelle 3: Pipettierschema V_H-Leader-Region PCR. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. µl: Mikroliter. µM: Mikromolar. V_H 1,3,4-Mix: Mix der Primer 1,3 und 4 mit Angriffspunkt in der Variablen Region der Immunglobulin-Schwerkette. 3'J_H-Mix: Mix der Primer mit Angriffspunkt in der Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. H₂O: destilliertes Wasser. ng/µl: Nanogramm/Mikroliter. DNA: Desoxyribonukleinsäure. V_H-Lead.-Reg.-Primer: V_H-Leader-Region-Primer. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase.

	Patientenprobe	Negativkontrolle
dNTP's [25 µM]	0,5 µl	0,5 µl
10x PCR-Puffer	5 µl	5 µl
5' V _H -Lead.-Reg.-Primer [10 µM] familienspezifisch	1 µl	1 µl
3' J _H -Mix [10 µM]	1 µl	1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,25 µl	0,25 µl
H ₂ O	40,25 µl	42,25 µl
Template (200 ng)	2 µl	-

Tabelle 4: PCR-Protokoll für die Amplifikation des VDJ-Rearrangements mittels Leader-Region-Primer. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. VDJ-Rearrangement: Rearrangement der Kombinationssequenz aus Variable-, Diversity- und Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. Min.: Minuten. Sek.: Sekunden.

95°C	15 Min.	Aktivierung
95°C	45 Sek.	38 Zyklen
60°C	1 Min.	
72°C	1 Min. 30 Sek.	
72°C	10 Min.	Extension
4°C	unbegrenzt	Lagerung

2.3.4. DNA-Amplifikation der VJ-Leichtkette mittels Polymerasekettenreaktion

(39, 46, 77, 78, 83, 123)

Die Sequenzierung der Leichtketten wird mit genomischer DNA oder cDNA (2 µl) unter Verwendung der V_λ- und V_κ-Leader-Region-Primer zusammen mit den entsprechenden J-Konsensus Primern durchgeführt. Zur Amplifikation des V_κ-Rearrangements werden die V_κ-Primer 1-4 jeweils einzeln zusammen mit einem 5'-J_κ-Primer-Mix aus den Primern für J_κ1,2,4 + J_κ3 + J_κ5 eingesetzt. Zur Amplifikation des V_λ-Rearrangements werden die V_λ-Primer zusammen mit einem 5'-J_λ-Primer-Mix aus den Primern für J_λ1 + J_λ2,3 + J_λ6,7 eingesetzt. Dabei werden die V_λ-Primer V_λ3a + V_λ3b sowie V_λ7 + V_λ8 jeweils in einem gemeinsamen Reaktionsansatz verwendet. Die restlichen V_λ-Primer werden jeweils einzeln eingesetzt. Für die V_λ-PCR wird in einem Reaktionsansatz 200 ng DNA, 0,2 mM von

jedem dNTP, 2,5 mM MgCl₂, jeweils 0,125 µM des entsprechenden Primers, 10x PCR Rxn Puffer (Invitrogen) und 2,5 U Platinum[®]Taq (Invitrogen Paisley, United Kingdom) zugesetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und nach folgendem PCR-Schema amplifiziert:

Tabelle 5: PCR-Protokoll für die Amplifikation des V_λJ_λ-Rearrangements. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_λJ_λ-Rearrangement: Rearrangement der Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. Min.: Minuten. Sek.: Sekunden.

95°C	2 Min.	
95°C	30 Sek.	40 Zyklen
61°C	30 Sek.	
72°C	30 Sek.	
72°C	5 Min.	Extension
4°C	unbegrenzt	Lagerung

Der Reaktionsansatz der V_λ-PCR wird nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 6: Pipettierschema der V_λ-PCR. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_λ: Variable Region der Lambda-Leichtkette. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. V_λ-Primer-Mix: Mix der Primer für die Variable Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. 5'-J_λ-Primer-Mix: Mix der 5'-Primer für die Joining Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. MgCl₂: Magnesiumchlorid. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. DNA: Desoxyribonukleinsäure. ng/µl: Nanogramm/Mikroliter. H₂O: destilliertes Wasser. U: units/Einheiten. µM: mikromolar. mM: millimolar

	Konzentration	µl/Reaktion
dNTP's	200,00 µM	5
10x PCR buffer	1x	5
Jeweiliger V _λ -Primer-Mix	0,125 µM	2
5'-J _λ -Primer-Mix	0,125 µM	2
MgCl ₂	2,5 mM	3
Taq-Polymerase	2,5 U	0,5
DNA (200ng/µl)		1
H ₂ O		31,5
		50

Für die V_κ-PCR werden in einem 50 µl Reaktionsansatz 200 ng DNA, 0,2 mM von jedem dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 2,5U Platinum[®]Taq, jeweils 0,125 µM des entsprechenden Primers und 10x PCR Rxn Puffer (Invitrogen) zugesetzt, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und nach folgendem PCR-Schema amplifiziert:

Tabelle 7: PCR-Protokoll für die Amplifikation des $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangements. $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rearrangement: Rearrangement der Kombinationssequenz aus Variable Region und Joining Region der Kappa-Leichtkette. Min.: Minuten. Sek.: Sekunden.

95°C	2 Min.	1x initial
65°C	1 Min.	
72°C	1 Min.	

95°C	30 Sek.	40 Zyklen
61°C	30 Sek.	
72°C	45 Sek.	
72°C	5 Min.	Extension
4°C	unbegrenzt	Lagerung

Der Reaktionsansatz für die V_{κ} -PCR wird nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 8: Pipettierschema der V_{κ} -PCR. In Klammern aufgeführt der Kappa-Deleting-Element-Primer (KDE-Primer) der zur Amplifizierung eines V_{κ} KDE-Rearrangements in gleicher Reaktion eingesetzt wird. (siehe **2.8./Tabelle 15**) V_{κ} KDE-Rearrangement: Kombinationssequenz aus Variable Region der Kappa-Leichtkette und Kappa-Deleting-Element. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. V_{κ} : Variable Region der Kappa-Leichtkette. dNTP's: Desoxynukleotridiphosphate. V_{κ} -Primer: Primer für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. 5'- J_{κ} -Primer-Mix: Mix der 5'-Primer für die Joining Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. $MgCl_2$: Magnesiumchlorid. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. DNA: Desoxyribonukleinsäure. ng/ μ l: Nanogramm/Mikroliter. H_2O : destilliertes Wasser. U: units/Einheiten. μ M: mikromolar. mM: millimolar

	Konzentration	μ l/Reaktion
dNTP's	200,00 μ M	5
10x PCR buffer	1x	5
$MgCl_2$	2,0 mM	2
Jeweiliger V_{κ} -Primer	0,125 μ M	2
5'- J_{κ} -Primer Mix	0,125 μ M	2
(KDE-Primer)	(0,125 μ M)	(2)
Taq-Polymerase	2,5 U	0,5
DNA (200ng/ μ l)		1
H_2O		30,5
		50

Folgende Primer werden zur Amplifikation der Immunglobulin-Leichtketten verwendet:

2.3.4.1: Sequenzen der V_{κ} -Primer (77)

- $V_{\kappa}1$: 5'-GACATCCRGWTGACCCAGTCTCCWTC
- $V_{\kappa}2$: 5'-CAGWCTCCACTCTCCCTGYCCGTCA
- $V_{\kappa}3$: 5'-TCTCCATGSCACCCTGTCTKTGTCTC
- $V_{\kappa}4$: 5'-AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC

2.3.4.2: Sequenzen der J_κ-Konsensus-Primer (77)

- J_κ1, 2, 4: 5'-ACTCACGTT TGATYTCCASCTTGGTCC
- J_κ3: 5'-GTA CTTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC
- J_κ5: 5'-GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC

2.3.4.3: Sequenzen der V_λ-Primer (78)

- V_λ1: 5'-GGTCCTGGGCCCAGTCTGTG
- V_λ2: 5'-CAGTCTGCCCTGACTCAGCCT
- V_λ3a: 5'-CTCAGCCACCCTCAGTGTCCGT
- V_λ3b: 5'-CTCAGCCACCCTCGGTGTCAGT
- V_λ4: 5'-TTTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC
- V_λ6: 5'-GAGTCTCCGGGGAAGACGGTA
- V_λ7: 5'-GTGGTACTCAGGAGCCCTCAC
- V_λ8: 5'-ACTGTGGTGACCCAGGAGCCA
- V_λ9: 5'-GCTGACTCAGCCACCTTCTGCA

2.3.4.3: Sequenzen der J_λ-Konsensus-Primer: (78)

- J_λ1: 5'-GCCACTTACCTAGGACGGTGAC
- J_λ2, 3: 5'-GAAGAGACTCACCTAGGACGGTC
- J_λ6, 7: 5'-GGAGACTCACCGAGGACGGTC

2.3.5. Optische Auswertung der PCR durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Durch die Agarose-Gel-Elektrophorese gelingt die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach deren Länge im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich dabei indirekt proportional zur Molekülgröße des jeweiligen DNA-Fragments. Der Nachweis der V_H-Amplifikate erfolgt in einem 1,5%-igen Agarosegel bei einer über 30 Minuten angelegten Spannung von 115 Volt. Dabei werden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl BlueJuice-Gel-Loading-Buffer gemischt und in die Ladetaschen des Agarosegels überführt. Die Größenabschätzung der DNA-Fragmente gelingt durch Vergleich mit dem in einer separaten Ladetasche mitgeführten Längenstandard. (100 bp DNA-Ladder, Fa. Gibco[®] BRL) Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar und können mit Hilfe des EagleEye[®]-Systems abgefilmt, ausgedruckt und ausgewertet werden. Bei einer sichtbaren Bande im Agarosegel und gleichzeitigem Fehlen einer Bande für die Negativkontrolle wird das DNA-Amplifikat der GeneScan[®]-Analyse unterzogen.

2.4. GeneScan[®] Analyse

2.4.1 Erläuterung des methodischen Prinzips

Durch Fluoreszenzmarkierung, der zur Amplifikation eines PCR-Produkts nötigen Primer, gelingt die Differenzierung der zu analysierenden Produkte. Bei der GeneScan[®] Analyse wandern die PCR-Produkte durch ein hochauflösendes Polyacrylamidgel. (PA-Gel) Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich umgekehrt proportional zur Molekülgröße des PCR-Amplifikates. Nach Durchlaufen einer definierten Strecke im PA-Gel werden die an das PCR-Produkt gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe von einem Argonionenlaser angeregt. Das zurückgestrahlte Fluoreszenzlichtsignal bestimmter Wellenlänge wird dann von einer CCD-Kamera detektiert und über die spezielle GeneScan[®] Software in einen Peak bestimmter Farbe übersetzt. Die Methode erlaubt die Bestimmung der Länge eines bestimmten PCR-Produkts sowie eine Abschätzung der Menge eines PCR-Produktes in einem gegebenen Ansatz. Da für die GeneScan[®] Analyse mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung stehen, können darüberhinaus mehrere PCR-Produkte anhand unterschiedlicher Fluoreszenzsignale differenziert werden.

2.4.2. Durchführung der GeneScan[®] Analyse

Die GeneScan[®]-Analysen werden mit dem AbiPrism[®]-DNA-Sequenzierer 377 nach den Protokollvorgaben von AbiPrism[®] durchgeführt. Die PCR-Proben durchwandern im elektrischen Feld ein 4,5%-iges Polyacrylamidgel. Zur Herstellung des Gels werden 45 ml 40% Acrylamide/Bis Solution 40:1, 40 ml 10x TBE, 144 g Harnstoff und 200 ml H₂O_d vermischt, durch ein Vakuumfiltersystem entgast und nach Zugabe von 350 µl APS und 25 µl TEMED zur Polymerisation gebracht. 25 ml dieser Mischlösung werden umgehend mit einer Perfusorspritze über einen speziellen Aufsatz zwischen zwei 36 cm lange, mit Abstandshaltern versehene, Glasplatten gegossen. Nach etwa 2 Stunden ist das Gemisch zwischen den Platten auspolymerisiert und die zu analysierenden PCR-Produkte können auf das Gel aufgetragen werden. Die Einstellung des AbiPrism[®]-377-DNA-Sequenzierers müssen für die GeneScan[®]-Analysen angepasst werden. Folgende Run-Module werden dabei gewählt. Plate Check: Modul „Plate-Check E“, PreRun: Modul „PR36E-2400“, Run: Modul „36E-2400“. 1 µl des zu analysierenden PCR-Produkts wird in 1,5 µl Formamid, 1 µl TAMRA-Längenstandard sowie 1 µl LB (Loading Buffer) aufgenommen. Dieser 4,5 µl

beinhaltende Reaktionsansatz wird dann für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. 1 µl wiederum wird dann über einen speziellen Kamm auf das PA-Gel aufgetragen.

2.4.3 Auswertung der GeneScan® Analyse

Jeder der drei in einem Ansatz verwendeten V_H-Primer (V_H1, V_H3 und V_H4 bzw. V_H2, V_H5 und V_H6) ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert und fluoresziert mit Licht anderer Wellenlänge. Die Zuordnung von Primer und Farbstoff ist in **Abb.5** und **Tab.9** ersichtlich. So kann aus der Wellenlänge des detektierten Fluoreszenzsignal der spezifische V_H-Primer und somit die V_H-Familie des CLL-Patienten ermittelt werden. Da drei Fluoreszenzfarbstoffe von der CCD-Kamera erkannt werden, lassen sich maximal drei V_H-Primer in einem PCR-Ansatz poolen.

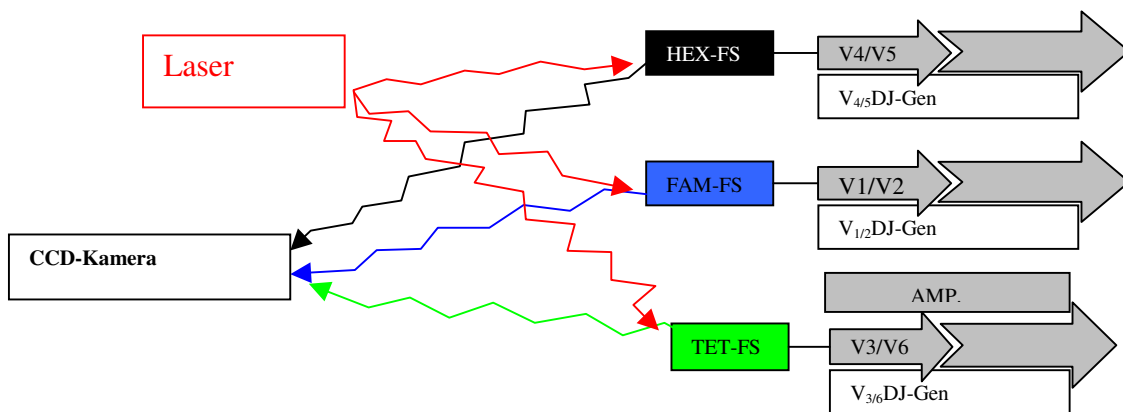


Abb. 5: Prinzip der GeneScan® Analyse: HEX/FAM/TET = Eigenname des jeweiligen Farbstoff (FS) zur Markierung der Amplifikate (=graue Pfeile). Template = weisses Rechteck. Farbige Pfeile = vom angeregten Farbstoff zurückgestrahltes Licht einer bestimmten Wellenlänge, dass von der CCD-Kamera detektiert wird. Zuordnung: HEX-FS an V4 bzw. V5. FAM-FS an V1 bzw. V2 und TET-FS an V3 bzw. V6. AMP.=Amplifikat. CCD-Kamera: Charge Coupled Device Kamera. V: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette jeweils nach Familienzugehörigkeit bezeichnet mit 1-6.

Tabelle 9: Markierung der Primer mit Genescan-Fluoreszenzfarbstoffen. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette jeweils nach Familienzugehörigkeit bezeichnet mit 1-7.

Primer	Fluoreszenzfarbstoff	Farbsignal im Genescan
V _H 1/7 bzw. V _H 2	FAM	Blau
V _H 3 bzw. V _H 5	TET	Grün
V _H 4 bzw. V _H 6	HEX	Schwarz

Je nach detektiertem Lichtsignal kann auf den Primer geschlossen werden, der zur Produktbildung in der PCR geführt hatte. Zur Kontrolle der Fragmentgröße dient der Vergleich mit dem in jeder Probe mitgeführten Längenstandard. Aus der Signalintensität

des detektierten Fluoreszenzsignals kann des Weiteren die Menge an markiertem PCR-Produkt abgeschätzt werden.

2.5. Klonierung von PCR-Produkten

2.5.1 Methodisches Prinzip der Klonierung

Patientenproben, die bei der GeneScan Analyse mehr als ein PCR-Produkt für eine V_H -Familie zeigen und bei denen die direkte Sequenzierung des vom Tumorklon umgelagerten V_H -Rearrangements nicht gelingt, werden durch Klonierungsexperimente weiter untersucht. Die Klonierungsexperimente werden mit dem TOPO-TA-Cloning[®] Kit (Fa. Invitrogen[®]) nach den Herstellerprotokollen durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Amplifikation eines einzigen DNA-Fragments, nachdem dieses in ein modifiziertes Bakterium (TOP10 One Shot[®] Chemically Competent E.coli) eingebracht worden ist. Als Vektor wird der pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor aus dem TOPO-TA[®]-System verwendet. Der Vektor enthält neben Resistenzgenen für Kanamycin und Ampicillin ein Lac-Operon, das für das E.coli Bakterium letale ccdB-Gen (coupled cell division B-Gen) beinhaltet. Die Ligation eines PCR-Amplifikats in dieses Gen unterbricht den Leserahmen des ccdB Gens und verhindert dessen Expression. Auf diese Weise wird eine positive Selektion des E.coli-Klons in den der Vektor mit dem PCR-Produkt transformiert worden ist, erreicht.

2.5.2. Ligationsreaktion

In der Ligationsreaktion wird das durch die Taq-Polymerase amplifizierte DNA-Fragment in den pCR[®]4-TOPO[®] Vektor eingebaut. Die Durchführung geschieht exakt nach Herstellerangaben.

Tabelle 10: Reagenzien für die Ligationsreaktion des PCR-Produktes mit Plasmid-DNA. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. DNA: Desoxyribonukleinsäure. H₂Od: destilliertes Wasser . TOPO: Eigenname des Vektors der Firma Invitrogen. µl: Mikroliter

PCR-Produkt	2 µl
Salt Solution	1 µl
H ₂ Od	2 µl
TOPO [®] -Vektor	1 µl

2.5.3 Transformationsreaktion

Bei der Transformationsreaktion wird der mit dem PCR-Produkt ligierte Plasmid-Vektor in die TOP 10 E.coli-Zelle nach dem Invitrogenprotokoll eingeschleust. Zellen, die einen nicht-rekombinanten Vektor aufnehmen, sterben in Folge der Expression des ccdB Gens ab. In einem Brutschrank bei 37°C inkubiert, können sich die E.coli-Zellen, die rekombinante Plasmid-Vektoren enthalten für etwa 20 Stunden vermehren und bilden in diesem Zeitraum etwa 0,5-1 mm große Klonkolonien.

2.5.4. Anlegen einer Bakterienflüssigkultur

Um eine weitere Vermehrung der Bakterien zu erreichen werden 10-20 Klonkolonien von der Agarplatte mit sterilen Impfösen abgelöst und jeweils in ein steriles Reaktionsgefäß (Snap-Cap®) mit 5 ml flüssigem, kanamycinhaltigen (100 mg/ml) LB-Medium überführt. Die Kolonie wird dann in der Flüssigkultur für mindestens 20 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln (ca. 220 rpm) inkubiert.

2.5.5. Plasmidextraktion

Um das PCR-Amplifikat für weitere Analysen verwenden zu können, muss das rekombinante Plasmid aus der E.coli-Zelle herausgelöst und isoliert werden.

Dieser Reaktionsschritt wird mit dem QIAprep®-Miniprep-System der Firma Qiagen® nach den Herstellervorgaben und unter Verwendung entsprechender Pufferlösungen durchgeführt. Sowohl Reinigung als auch Elution der Plasmid-DNA erfolgen nach dem gleichen Reaktionsprinzip und Protokoll wie die im nächsten Absatz erläuterte Aufreinigung von PCR-Produkten im QIAquick®-8-PCR-Purification Kit.

2.6. Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte sequenzieren zu können müssen diese aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wird mit dem QIAquick[®]-8-PCR-Purification-Kit nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die QIAquick[®]-Aufreinigung macht sich dabei die selektiven Bindungseigenschaften einer speziellen Silikatgelmembran zu Nutze. An die Membran wird über eine spezielle Vakuumpumpe (QIAvac[®]) ein Vakuum von -300 mbar angelegt, bis der gesamte Reaktionsansatz durch die Membran gezogen wird. Dabei adsorbiert das im Ansatz befindliche PCR-Produkt unter hoher Salzkonzentration an die Membran, während unerwünschte Bestandteile wie die Oligonukleotidprimer oder Verunreinigungen ungehindert durch die Säule fließen und in einem Auffanggefäß gesammelt und verworfen werden. Die membrangebundene DNA wird dann zweimal mit dem ethanolhaltigen PE-Buffer gewaschen um Salze zu entfernen, die die Elution der DNA negativ beeinflussen. Auch hier wird das Reagenz mit Hilfe eines Vakuums durch die Membran gezogen. Zuletzt wird die DNA mit 75 µl EB-Buffer unter Anlage eines Vakuums von ca. -400 mbar aus der Membran eluiert.

2.7. DNA-Sequenzierung

2.7.1. Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion schafft die Ausgangsbedingungen für die Dekodierung der Basenabfolge eines DNA-Abschnitts. Unter Einsatz des familienspezifischen V_H-Primers synthetisiert eine DNA-Polymerase (AmpliTa[®]-DNA-Polymerase) aus dem gereinigten PCR-Produkt als Vorlage den komplementären DNA-Strang. Es werden ddNTP's zugesetzt, welchen die 3'-OH-Gruppen für die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zum Zwecke der Kettenverlängerung fehlen. Diese werden von der DNA-Polymerase zufällig eingebaut und führen zum sofortigen Abbruch der Kettenverlängerung durch die Polymerase. Diese Stoppnukleotide sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. So entstehen DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge um jeweils 1 Base unterscheiden und an deren Ende ein für die jeweilige Endbase spezifischer Farbstoff gebunden ist. Die fluoreszenzmarkierten ddNTP's (dye-terminators), die ungelabelten dNTP's, sowie die

DNA-Polymerase (AmpliTaq[®]-DNA-Polymerase) sind im BigDye[®]-Ready-Reaction-Mix bereits in den optimalen Konzentrationen enthalten. Die DNA-Fragmente werden dann in einer hochauflösenden Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs nach einer bestimmten Gelstrecke detektiert.

Tabelle 11: Reaktionsansatzschema der Sequenzreaktion: Gesamtvolumen je Ansatz: 20 µl. µl: Mikroliter. µM: Mikromolar. H₂Od: destilliertes Wasser

BigDye [®] Ready Reaction Mix	6 µl
Primer [1 µM]	4 µl
H ₂ Od	4 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	6 µl

Analog der PCR-Reaktion werden die DNA-Doppelstränge zunächst denaturiert dann erfolgt das Primerannealing sowie die Elongation durch die DNA-Polymerase. 25 Reaktionszyklen ergeben ausreichende Mengen an markierten DNA-Fragmenten.

Tabelle 12: Reaktionsprogramm der Sequenzreaktion. Min.: Minuten. Sek.: Sekunden.

96°C	45 Sek.	25 Zyklen
96°C (Denaturierung :)	10 Sek.	
50°C (Annealing)	5 Sek.	
60°C (Elongation)	4 Min.	
4°C	unbegrenzt	

2.7.2 Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte

Um überschüssige Stoppnukleotide, die die weitere Sequenzanalyse behindern würden, aus der Probe zu entfernen wird das DyeEx[®]-Spin-Kit der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers verwendet, das sich das Prinzip der Gel-Chromatographie zu Nutze macht. Die in der Säule befindliche spezielle Polymermatrix von poröser Konsistenz hält kleine Moleküle, die in die Poren der Matrix diffundieren, zurück. Die Porengröße ist hier so gewählt, dass nur die freien Stoppnukleotide der BigDye[®]-Lösung von der stationären Phase zurückgehalten werden. Die Chromatographie-Säulen des Qiagen-Kits sind im 96-Well Format erhältlich. Nach protokollgemäßer Vorbereitung der DyeEx[®]-Well Platte wird das Gesamtvolumen der Sequenzreaktion (20 µl) auf die Polymermatrix aufgebracht, zentrifugiert (2350 rpm, 3 Minuten) und in eine 96 Well Titerplatte eluiert. Das Eluat wird

auf einem Metallblock hitzetrocknet (70°C für ca. 45 Minuten) und schließlich in 3,5 µl Loading Buffer (Formamid: Blue Dextran/EDTA 4 : 1, pH=8,0) aufgenommen.

2.7.3 Sequenzanalyse: Detektion der „Kettenabbruchfragmente“

Die elektrophoretische Auftrennung, der durch die Sequenzreaktion synthetisierten Kettenabbruchfragmente wird über das hochauflösende 4,5%-ige Polyacrylamidgel (siehe 2.4.2) durchgeführt. Der DNA-Sequenzer 377 der Firma *AbiPrism*[®] gewährleistet den Aufbau des elektrischen Feldes im Gel, sowie die Anregung und Detektion der an die Stoppnukleotide gebundenen Farbstoffe. Folgende Run Module müssen in der Software ausgewählt werden. Plate-Check: Modul „Plate-Check E“, PreRun: Modul „PR36E-2400“ und Run: Modul „36E-2400“. Die aufgereinigten Sequenzreaktionsprodukte (siehe 2.7.2) werden mit einer Temperatur von 95°C über 3 Minuten denaturiert. Mit Hilfe einer 8-Kanal-Präzisions-Pipette (Kloehn, Las Vegas) wird jeweils 1 µl der Probe auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und die Spannung am Gel angelegt. Anschliessend wird Base für Base die Sequenz des entsprechenden DNA-Fragments als Abfolge von Fluoreszenzsignalen, wie in 2.7.1. erläutert, dekodiert.

2.7.4 Sequenzauswertung

2.7.4.1. Prozedere der Auswertung

Die mit dem DNA-Sequenzer-*AbiPrism-377* ermittelte Abfolge von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Wellenlänge wird mit der speziellen *ABI-Prism*[®]-DNA-Sequencing-Analysis-Software in die Basenabfolge des analysierten DNA-Segments übersetzt. Die Information steht sowohl in Form einer graphischen Darstellung als sogenanntes Elektropherogramm, als auch in Form einer Textdatei zur Verfügung. Mit Hilfe dreier verschiedener online-Immunglobulin-Datenbanken und entsprechender Alignment-Software (V-Base: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html>; IMGT: <http://imgt.cines.fr>, Genbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) kann dann die Sequenz mit den bisher in der Literatur identifizierten Keimbahn-V_H-Genen und

Pseudogenen abgeglichen werden. Das Programm ermittelt dabei die am nächsten verwandte Keimbahnsequenz und die Anzahl und Verteilung von Basenabweichungen (V.a. Punktmutationen aber auch Insertionen, Deletionen und Duplikationen) in der analysierten Sequenz. Die V_H -Homologie errechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl mutierter Nukleotide und der Gesamtzahl an Nukleotiden des nächstverwandten Keimbahn- V_H -Gens bzw. Genfragments. Insertionen, Deletionen oder Duplikationen werden unabhängig von der Anzahl der betroffenen Nukleotide bei der Berechnung als eine Mutation gewertet. V_H - bzw. V_L -Sequenzen mit weniger als 98% Keimbahnhomologie werden dabei als V_H -mutiert betrachtet. (23, 52, 73)

Ebenso wird die Position der CDR- und FR-Regionen im Gen ermittelt. (62) Um Lesefehler der Taq-Polymerase oder Verwechslungen verschiedener Patientenproben auszuschließen, wird jede Probe durch Sequenzierung eines unabhängigen PCR-Produkts verifiziert.

2.7.4.2. Bestimmung der V_H -, D- und J_H -Segmente/Regionen

Die analysierte Sequenz wird mit der V_H -Familie sowie der speziellen Nummerierung des nächst verwandten Keimbahngens benannt. (z.B. V_H3-21) Die vorhandenen Mutationen werden auf dem Sequenzausdruck markiert. Führt die Mutation in dem jeweiligen Codon zu einem Aminosäureaustausch, so wird die Mutation als R-Mutation (R=Replacement) gekennzeichnet. Bewirkt die Mutation jedoch keinen Austausch, so wird sie als S-Mutation (S=Silent) gekennzeichnet. Sequenzen, die in einer hohen Anzahl an Basen (mehr als 10) von der nächst verwandten Keimbahnsequenz abweichen werden zur korrekten Bezeichnung genauer analysiert. Ist nach der Datenbank-Analyse das nächstverwandte Keimbahngens ein Pseudogen und existiert ausserdem ein produktives V_H -Gen, das nur um 2 oder weniger Basen mehr von der analysierten Sequenz abweicht, so wird das produktive V_H -Rearrangement als nächst verwandtes Keimbahngens gewählt. Die Identifizierung der J_H -Segmente wird ebenfalls durch Vergleich mit der entsprechenden Immunglobulin-Datenbank durchgeführt. Um Auswertungsfehler zu vermeiden werden alle bekannten J_H -Keimbahnsequenzen mit dem Sequenzausdruck per Hand verglichen, um das jeweils umgelagerte J_H -Segment zu ermitteln. Zur Identifizierung der D-Segmente wird die spezielle Software EditSeq[®] und Align-DNA[®] der Firma DNASTar eingesetzt. Es werden bei der Identifizierung der D-Segmente die Kriterien von Corbett et al. (19) für die

geforderte Übereinstimmung der Nukleotide des D-Segments mit der Keimbahn-D-Sequenz angelegt. Wenigstens 7 aufeinanderfolgende Nukleotide werden an die nächst gelegene Keimbahnsequenz angelegt („aligned“) um ein D-Segment zu identifizieren. Die Sequenz wird von Beginn der CDR3-Region bis zum Beginn des identifizierten J_H-Segments gekennzeichnet. Mit Hilfe des Align[®]-Programms wird nun mit den Methoden von Wilbur-Lipman und Martinez-Needleman der gesamte D-Locus nach diesem Fragment abgesucht und so das passende D-Segment identifiziert. Abweichungen werden dabei gemäß den Kriterien von Corbett et al. (19) in den Suchkriterien zugelassen. Nicht in allen V_H-Rearrangements lässt sich ein D-Segment finden, welches den etwa 30 bekannten D_H-Keimbahngenomen entspricht oder den Kriterien nach Corbett et al. (19) genügt.

Somatische Hypermutation, sowie das zufällige Entfernen und Einfügen von Nukleotiden im Bereich der V_H-D_H bzw. D_H-J_H-Verbindungsstellen sind mögliche Ursachen dieser Veränderung der D_H-Keimbahnsequenz. Das jeweilige D-Segment wird im Sequenzausdruck gekennzeichnet. Der Leserahmen des D-Segments wird durch Vergleich mit dem Leserahmen der gesamten Sequenz ermittelt. Die Familien D2 und D3 werden als „long“ D-Segmente, die Familien D1, D4, D5 und D6 als „short“ D-Segmente zusätzlich bezeichnet. Alle dem Leserahmen entsprechenden Sequenzen der V_H- und V_L-Gen-Rearrangements werden in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Die Länge der HCDR3 und LCDR3 wird gemäß der Definition von Kabat et al. (62) bestimmt. Die HCDR3-Länge wird berechnet zwischen den Codons 95-102. Die LCDR3-Länge wird zwischen den Codons 89-97 bestimmt. (62) Vergleiche zwischen den HCDR3- und LCDR3-Regionen werden mittels der „multiple sequence alignment software Clustal X“ (Version 1,83 UBC Bioinformatics Centre, Vancouver, BC, Canada) für Windows durchgeführt. Hohe Übereinstimmung bzw. Homologie wird definiert als Aminosäureabweichung um nicht mehr als 1 Aminosäure von der am häufigsten auftretenden CDR3 Region, wohingegen Sequenzen mit geringerer Homologie von 2-3 Abweichungen als CDR3-Regionen mit mittlerer Übereinstimmung definiert werden. Die variablen Leichtketten-Gene (V_L-Gene) werden benannt entsprechend der Nomenklatur, die in der GenBank-Datenbank verwendet wird, um Verwechslungen zwischen V_H- und V_L-Genen zu vermeiden, da V_λ2-14 (Benennung in der GenBank-Nomenklatur) in der IMGT-Datenbank als V_λ3-21 bezeichnet wird.

2.8. Bestimmung des KDE-Rearrangements

Die Analyse der KDE-Rearrangements wurde bei 42 Proben mit bekannter λ -Leichtketten-Expression unter Verwendung entsprechend aufgeführter Primer vorgenommen. (47) Das Reaktionsvolumen beträgt jeweils 50 μ l. Die Amplifikation des Keimbahn-KDEs wird dabei mit identischem Schema und Bedingungen wie bei der vorher beschriebenen V_{κ}/J_{κ} -PCR durchgeführt mit Ausnahme einer kürzeren Elongationszeit von nur 30 Sekunden. (siehe **Tab. 7**) Folgendes Pipettierschema wird dabei angewendet:

Tabelle 13: Pipettierschema zur Amplifikation des Keimbahn-KDE-Rearrangements. KDE: Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. $MgCl_2$: Magnesiumchlorid. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. C_{κ} KDE-Primer: Primer zur Detektion der Kombinationssequenz aus Constant region der Kappa-Leichtkette (C_{κ}) des Immunglobulins und Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendem-Element. (KDE) KDE: Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. DNA: Desoxyribonukleinsäure. H_2O_d : destilliertes Wasser. μ M: mikromolar, mM: millimolar, U: units/Einheiten

	Konzentration	μ l/Reaktion
dNTP's	200,00 μ M	5
10x PCR buffer	1x	5
$MgCl_2$	2,0 mM	4
C_{κ} KDE-Primer	0,125 μ M	2
KDE-Primer	0,125 μ M	2
Taq-Polymerase	2,5 U	0,5
DNA		1
H_2O_d		30,5
		50

Die gleichen Bedingungen wie bei der Keimbahn-KDE-PCR werden angewendet für die Amplifikation des Rearrangements, das zwischen dem KDE und dem RSS in der J_{κ} - C_{κ} -Intron-Region liegt, mit Ausnahme einer geringeren $MgCl_2$ -Konzentration. (1,5 mM) Der Reaktionsansatz wird dabei nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 14: Pipettierschema zur Amplifikation des $J_{\kappa}C_{\kappa}$ -Intron-RSS-KDE-Rearrangements. $J_{\kappa}C_{\kappa}$ -Intron-RSS-KDE-Rearrangements: Kombinationssequenz, die entsteht durch Umlagern einer Intron-Recombination Signal Sequence (Intron-RSS), die zwischen der Joining region der Kappa-Leichtkette (J_{κ}) und der constant region der Kappa-Leichtkette (C_{κ}) liegt, an das Kappa-Leichtketten-deletierende Element (KDE). PCR: Polymerase-Kettenreaktion. $MgCl_2$: Magnesiumchlorid. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. $J_{\kappa}C_{\kappa}$ -Primer: Primer mit Angriffspunkt in der Intron-Region zwischen der Joining region der Kappa-Leichtkette und der Constant region der Kappa-Leichtkette. KDE: Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. $MgCl_2$: Magnesiumchlorid. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. DNA: Desoxyribonukleinsäure. H_2O_d : destilliertes Wasser. U: units/Einheiten. μM : mikromolar. mM: millimolar. μl : Mikroliter

	Konzentration	μl /Reaktion
dNTP's	200,00 μM	5
10x PCR buffer	1x	5
$MgCl_2$	1,5 mM	3
$J_{\kappa}C_{\kappa}$ -Primer	0,125 μM	2
KDE-Primer	0,125 μM	2
Taq-Polymerase	2,5 U	0,5
DNA		1
H_2O_d		31,5
		50

Die Primer zur Detektion des V_{κ} KDE-Rearrangements werden zur Einsparung von Reagenzien und Patienten-DNA einbezogen in die V_{κ} -PCR für die V_{λ} -exprimierenden Fälle.

Tabelle 15: Pipettierschema zur Amplifikation des V_{κ} KDE-Rearrangements, entsprechend der V_{κ} -PCR unter Hinzunahme des KDE-Primers. (**Vergleiche Tabelle 8**) V_{κ} KDE-Rearrangement: Kombinationssequenz aus Variable Region der Kappa-Leichtkette und Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element. PCR: Polymerase-Kettenreaktion. dNTP's: Desoxynukleotidtriphosphate. V_{κ} -Primer: Primer für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. 5'- J_{κ} -Primer-Mix: Mix der 5'-Primer für die Joining Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. $MgCl_2$: Magnesiumchlorid. Taq-Polymerase: Thermophilus aquaticus Polymerase. DNA: Desoxyribonukleinsäure. H_2O_d : destilliertes Wasser. U: units/Einheiten. μM : mikromolar. mM: millimolar

	Konzentration	μl /Reaktion
dNTP	200,00 μM	5
10x PCR buffer	1x	5
$MgCl_2$	2,0 mM	2
Jeweiliger V_{κ} -Primer	0,125 μM	2
5'- J_{κ} -Primer-Mix	0,125 μM	2
KDE-Primer	0,125 μM	2
Taq-Polymerase	2,5 U	0,5
DNA		1
H_2O_d		30,5
		50

2.8.1. Primer zur Detektion der KDE-Rearrangements (47)

- V_K-Primer: siehe **2.3.4.1.**
- C_KKDE-Primer: 5'-CTCACTGAGCCTCCCTTGAATAGTCC
- J_KC_K-(Intron-RSS)-Primer: 5'-CCGCGGTTCTTTCTCGATTGAGTGG
- KDE-Primer: 5'-AGACAGGTCCTCAGAGGTCAGAGC

2.9. Bestimmung der CD38-Expression durch FACS-Analyse (Durchflußzytometrie)

2.9.1. Messprinzip der FACS-Analysen

Zur Bestimmung der CD38-Expression werden FACS-Analysen (Fluorescence-Activated Cell Sorter) durchgeführt. Bei dieser Methode werden membranständige Antigene von Leukozyten mit spezifischen Antikörpern detektiert. An diese Antikörper sind Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Die Einzelzellen werden suspendiert, in eine Meßküvette gegeben und in einer Trägerflüssigkeit an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeführt. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und die überschießende Energie in Form eines Photons einer höheren Wellenlänge wieder emittiert. Diese Photonen werden von einer Kamera detektiert, wodurch der Anteil der für das zu messende Oberflächenantigen positiven Zellen in dieser Probe ermittelt werden kann.

2.9.2. Eingesetzte Antikörper

Zur Messung der CD38-Expression auf CLL-Zellen werden gegen die Oberflächenantigene CD5, CD19 und CD38 gerichtete Antikörper verwendet. Zur näheren Charakterisierung der zu messenden Zellpopulation werden Antikörper gegen CD5 und CD19 eingesetzt, da sich Tumorzellen der CLL durch Koexpression dieser Marker definieren lassen.

- Folgende Antikörper werden zur Messung eingesetzt:
 1. CD5-FITC/Klon L17F12
 2. CD38-PE/Klon HB-7
 3. CD19-PerCP Cy5.5/Klon SJ25Cl

- Folgende Kontrollantikörper dienen zur einmaligen Instrumenteneinstellung:
 1. IgG2a-FITC/Klon X39
 2. IgG1-PE/Klon X39
 3. IgG1-PerCP Cy 5.5/Klon X40

2.9.3. Vorbereitung der Proben

Zur Messung der CD38-Expression werden Zellen verwendet, die in einem DMSO-haltigen Medium (Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff (-196°C) viabel kryokonserviert sind. Dabei wurden 43 Patienten analysiert. Zunächst werden die Zellen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden sie in 10 ml des RPMI-Mediums (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin) aufgenommen und für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 5 ml 1x PBS und 1% BSA aufgenommen. Es erfolgt ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm. (10 Minuten) Nach Aufnahme des Zellpellets in 1 ml 1x PBS und 1% BSA wird die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Da für jede Messung 5×10^5 Zellen benötigt werden, wird das entsprechende Volumen in spezielle FACS-Reaktionsgefäße überführt und mit 1x PBS und 1% BSA auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die Inkubation mit den verwendeten Antikörpern erfolgt anschließend in einem 2. Schritt. Dabei werden zwei Ansätze pro Patient pipettiert:

1. Ansatz: CD5-FITC (10 µl), CD19-PerCP Cy5.5 (3 µl) und IgG1-PE (8 µl)
2. Ansatz: CD5-FITC (10 µl), CD19-PerCP Cy5.5 (3 µl) und CD38-PE (8 µl)

Nach einer Inkubationszeit beider Ansätze von 30 Minuten bei 4°C werden die Proben mit 4 ml 1x PBS und 1% BSA gewaschen. (Zentrifugation bei 1200 rpm, 5 Min.) Zur Messung werden die Zellen schließlich in 500 µl 1x PBS aufgenommen.

2.9.4 Ermittlung unspezifischer Eigenfluoreszenzen

Zur Durchführung der FACS-Analyse wird das Gerät FACScan[®] der Firma Becton Dickinson (Erembodegem-Aalst, Belgien) verwendet. Vor der ersten Messung werden durch eine Kontrollmessung Überstrahlungsphänomene von Lichtspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt und der Einfluss unspezifischer Eigenfluoreszenzen ermittelt. Die in dieser Messung erhobenen Daten werden für alle folgenden Patientenproben beibehalten. Es wird eine Probe verwendet, in der die drei Kontrollantikörper IgG2a-FITC/Klon X39, IgG1-PE/Klon X39 und IgG1-PerCP Cy 5.5/Klon X40 mit den Zellen einer Patientenprobe inkubiert worden sind. Diese drei Antikörper sind mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wie die zur weiteren Messung verwendeten Antikörper gegen CD5, CD19 und CD38.

2.9.5. Messung der CD38-Expression

Eine erste Messung dient als CD38-Negativkontrolle. In diesem Ansatz werden die Antikörper CD5-FITC (10 μ l), CD19-PerCP Cy5.5 (3 μ l) und IgG1-PE (8 μ l) mit der Patientenprobe inkubiert. (siehe Kapitel **2.8.3.**) Anhand des Forward Scatters (Vorwärtsstreulicht) und des Side Scatters (Seitwärtsstreulicht) wird die Größe und Granularität der zu messenden Zellen in der Probe ermittelt und der Messbereich auf mononukleäre Zellen eingegrenzt. In einer weiteren Darstellung erfolgt die Eingrenzung der CD5-FITC und CD19-PerCP Cy5.5 positiven Zellpopulation. Als Negativkontrolle für die CD38-Bestimmung wird im folgenden IgG1-PE gegen CD19-PerCP Cy5.5 gegenübergestellt. In einem zweiten Schritt wird die CD38-Expression gemessen. Dazu werden wie bei der ersten Messung die CD5-FITC und CD19-PerCP Cy5.5 positiven Zellen ermittelt. Dann wird CD38-PE und CD19-PerCP Cy5.5 einander gegenübergestellt, um die CD38-positive Zellpopulation zu erhalten.

2.9.6. Auswertung der erhobenen Daten

In die Auswertung des CD-38-Expressionsgrades werden nur Patientenproben einbezogen, die keine unspezifische Eigenfluoreszenz aufweisen. Dabei werden des Weiteren nur Zellen, die sich durchflusszytometrisch wie Lymphozyten verhalten (ermittelt durch Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts) ausgewertet. Ermittelt wird der Anteil der CD38-positiven Zellen innerhalb der CD5/CD19-positiven Zellfraktion.

2.10. Bestimmung der ZAP-70 Expression durch FACS-Analyse

Die ZAP-70 Expression wird mittels eines ZAP-70-Antikörpers (Klon 2F3.2; Biomol, Hamburg, Germany) durch eine 4-Farben Durchflußzytometrie (CD5, CD19, CD3/56, ZAP-70) nach den Vorgaben von Crespo et al. (21) bei 10 Patienten gemessen. In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit wird die ZAP-70-Expression entweder in Frischblut oder in mononukleären Zellen aus eingefrorenen Proben gemessen. Nach Inkubation mit dem Anti-ZAP-70-Antikörper (Klon 2F3.2; Biomol, Hamburg, Germany) in einer Menge von ca. 1,5 µl pro 500.000 Zellen und entsprechenden Waschschritten wird der ZAP-70-AK mit einem goat-anti-mouse-FITC-Antikörper (Fa. DAKO) markiert. Zur anschließenden Oberflächenmarkierung dienen die Antikörper anti-CD3-PE (Klon SK7, BD Bioscience), anti-CD56-PE (Klon My 31, BD Bioscience), anti-CD19-ECD (Klon HD237, Beckman Coulter) und anti-CD5-PC5 (Klon BL1a, Beckman Coulter). Schließlich wird die Probe mittels Durchflußzytometrie (Gerät: EPICS XL-MCL, Beckman Coulter) analysiert. Das Gating der Zellen und die Bestimmung des ZAP-70-Expressionslevels wird ebenfalls nach den Vorgaben von Crespo et al. (21) durchgeführt. (Gating nach interner T-Zell-Population, Cut-Off-Level: 20% ZAP-70⁺-Zellen)

2.11. Zytogenetische Analysen

Zur Analyse der CLL-Proben im Hinblick auf chromosomale Aberrationen wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wie in Vorarbeiten beschrieben, angewendet. (33) 55 Patienten aus dem beschriebenen Kollektiv werden auf das Vorliegen folgender Aberrationen untersucht: Deletion-11q, Deletion-17p, Deletion-13q und Trisomie-12.

2.12. Auswertung der Daten und statistische Analysen

Neben den im Rahmen dieser Dissertation erhobene Daten wurden die von kooperierenden Arbeitsgruppen erhobene Daten aus den anderen Teilnahmeländern für die beschriebene Auswertungen genutzt. Die erhobene Daten wurden mit der Datenbank Microsoft Access Version 2000 verwaltet. Zur statistischen Analyse wurden folgende weitere Programme verwendet. StatXact (Cytel Software, Cambridge, Mass., USA), S-Plus (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA), Design software library und GraphPad Version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Californien, USA). Das Überleben wurde definiert als Zeit von Diagnosestellung bis zur letzten Verlaufsuntersuchung (follow-up) oder bis zum Tod. Zur Schätzung der medianen Überlebenszeiten von Patientengruppen ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde die Methode nach Kaplan und Meier verwendet (63). Zur Untersuchung von Überlebensdifferenzen zwischen verschiedenen Subgruppen wurde jeweils eine maximal selektierte Log-Rank Statistik durchgeführt. (70, 76) Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ erreicht. Es wurde dabei jeweils das 95%-Konfidenz-Intervall berechnet. (40)

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Struktur des V_H3-21-Gen-Rearrangements

Von 90 analysierten V_H3-21-Gen-Rearrangements, waren alle mit Ausnahme von 2 Fällen (Fall 36G und 89S) innerhalb des Leserahmens („in frame“) und potentiell funktionell umgelagert. Bei 57 Rearrangements (63%) wurden mehr als 2% Mutationen, mit einer medianen Mutationsrate von 3,1% (2,1-10%) innerhalb des V_H-Gens gefunden. 33 Fälle verfügten über V_H-Rearrangements mit nicht mehr als 2% somatischer Hypermutation und wurden somit als V_H-unmutiert gewertet. Ein D-Segment konnte bei 31 der 90 Rearrangements identifiziert werden. Am häufigsten ließen sich die Segmente D3-3 und D3-10 bei jeweils 5 Rearrangements finden. Bei den verbleibenden 59 V_H3-21 Rearrangements war es nicht möglich ein D-Segment zuzuordnen. Das am häufigsten benutzte J_H-Gen war J_H6, das bei 60 Rearrangements (67%) amplifiziert wurde, gefolgt von J_H4 in 16 Rearrangements. (18%) Eine Leichtkettenexpression (κ/λ) war für 67 Fälle bekannt. Alle V_H3-21 Sequenzdaten sind in der **Tabelle 16** (Sequenzen mit bekannter κ/λ-Leichtketten-Expression) und **Tabelle 17**. (Sequenzen mit nicht bekannter κ/λ-Leichtketten-Expression dargestellt)

Tabelle 16: V_H3-21-Genumlagerung, V_H- und V_L-Gen-Homologie und Funktionalität der V_H- und V_L-Rearrangements bei V_H3-21-Patienten **mit bekannter** κ/λ Expression. F.: in frame/innerhalb d. Leserahmens bzw. functional/funktionell. NF.: out of frame/ausserhalb d. Leserahmens bzw. non-functional/nicht funktionell. G. = Gen *: Bei Patient 4G konnten nur 2 geklonte Sequenzen amplifiziert werden. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. Homolog.: Homologie V_L: Variable Region der Immunglobulin-Leichtkette. V_H3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. PatNr.: Patientennummer. D-G.: Gen für die Diversity Region der Immunglobulin-Schwerkette. J_H-G.: Gen für die Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. κ/λ Exp.: Expression einer Kappa- bzw. Lambda-Leichtkette. V_κ: Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. V_κ-Gen: Gen für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. J_κ-G.: Gen für die Joining Region der Kappa-Leichtkette. V_λ-Gen: Variable Region der Lambda-Leichtkette. Die geographische Herkunft des Patienten ist in der entsprechenden Patientennummer mit einem Großbuchstaben erfasst: Deutschland (13G), Schweden (59S), Italien (94I), USA (109U), Finnland (68F) und Australien. (106A)

Pat Nr.	V _H -Gen-Homolog. (%)	D-G.	J _H -G.	V _H -Lese-rahmen (F/NF.)	κ/λ Exp	V _κ -Gen	V _κ -Gen Homolog. (%)	J _κ -G.	V _κ -Gen Lese-rahmen (F/NF.)	V _L -Gen	V _L -Gen Homolog. (%)	J _L -G.	V _L -Gen Lese-rahmen (F/NF.)
1G	97,1	3-10	4	F.	λ	L12	100	2	NF.	2-14	98,4	3	F.
2G	100	3-3	6	F.	λ	-	-	-	-	1-22	99,2	3	NF.
4G	91,2	-	4	F.	λ	A1	99,6	1/5	NF.	2-1*	100	3/2	F.
5G	98,0	-	6	F.	λ	B3	100	4	F.	2-14	98,0	3	F.

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 16

Pat Nr.	V _H -Gen-Homolog. (%)	D-G.	J _H -G.	V _H -Lese-rahmen (F./NF.)	κ/λ Exp	V _κ -Gen	V _κ -Gen Homolog. (%)	J _κ -G.	V _κ -Gen Lese-rahmen (F./NF.)	V _λ -Gen	V _λ -Gen Homolog. (%)	J _λ -G.	V _λ -Gen Lese-rahmen (F./NF.)
6G	97,3	-	6	F.	λ	O2/O1 2	100	4	NF.	2-14	99,6	3	F.
8G	100	3-22	6	F.	λ	L12 & A27	100 & 100	1 & 1	NF. & NF.	2-14	99,6	3	F.
13G	97,3	-	6	F.	λ	O2/O1 2 & B3	100 & 100	2 & 1	NF. & F.	2-14	99,2	3	F.
17G	93,7	2-2	6	F.	λ	O8/O1 8	100	4	NF.	1-17 & 2- 1	95,8 & 97,2	3 & 2	F. & F.
18G	95,5	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,4	3	F.
27G	96,4	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	99,2	3	F.
35G	98,2	-	1	F.	λ	A27	100	5	NF.	2-14	99,2	1	F.
36G	99,1	2-15	4	NF.	κ	O8/O1 8 & A27	100 & 100	4 & 3	F. & NF.	-	-	-	-
37G	97,8	-	4	F.	λ	-	-	-	-	2-14	99,2	3	F.
38G	97,8	-	6	F.	λ	O8/O1 8	100	1	NF.	2-14	99,2	3	F.
55G	96,3	-	6	F.	λ	L1 & A1 & A27	99,6 & 100 & 98,3	5 & 2 & 5	NF. & F. & NF.	2-14	98,0	3	F.
59S	99,1	-	6	F.	λ	O8/O1 8 & A17	100 & 100	4 & 1	NF. & F.	2-14	98,4	3	F.
60S	98,2	-	6	F.	λ	A1 & B3	99,2 & 100	2 & 2	NF. & NF.	2-14	97,2	3	F.
61S	96,9	-	6	F.	λ	O4	100	5	NF.	2-14 & 2- 11	98,4 & 98,7	3 & 3	F. & NF.
62S	96,4	-	6	F.	λ	O2	98,5	4	NF.	2-14	97,6	3	F.
63S	97,8	-	6	F.	λ	A18	100	4	NF.	-	-	-	-
64S	95,9	-	6	F.	λ	A27	100	3	NF.	2-14	98,0	3	F.
65S	95,9	-	6	F.	λ	A2	100	4	NF.	2-14	98,8	3	F.
67	96,4	-	6	F.	λ	O2 &	100 & 100	4 & 4	NF. &	2-14	98,0	3	F.
68F	96,4	-	6	F.	λ	A20 & L6	100 & 98,1	2 & 4	NF. & NF.	2-14	98,0	3	F.
69S	97,3	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,4	3	F.
70S	96,4	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	99,6	3	F.
71S	99,1	-	6	F.	λ	A27 & B3	100 & 100	4 & 4	NF. & NF.	2-14	98,0	3	F.
72S	99,6	-	6	F.	λ	L9 & B3	100 & 100	4 & 4	NF. & NF.	2-14	98,4	3	F.
73S	95,9	-	6	F.	λ	O8/O1 8 & B3	100 & 97,2	4 & 3	NF. & NF.	2-14	98,0	3	F.
74S	96,4	-	6	F.	λ	A18 & L12	99,6 & 100	2 & 4	NF. & NF.	2-14	98,4	3	F.
75S	99,1	-	6	F.	λ	B3	100	2	NF.	2-14	98,4	3	F.
76F	100	-	6	F.	λ	O8/O1 8	100	5	NF.	2-14	99,2	3	F.
77S	95,1	-	6	F.	λ	A3/A1 9	99,6	4	NF.	2-14	98,4	3	F.
78S	95,9	-	6	F.	λ	-	-	-	-	3-4	96,3	3	NF.
79S	96,9	-	6	F.	λ	O8/O1 8	100	3	NF.	2-14	99,2	3	F.

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 16

Pat Nr.	V _H - Gen- Homo- log. (%)	D- G.	J _H - G.	V _H - Lese- - rahmen (F/ NF.)	κ/λ Exp	V _κ - Gen	V _κ -Gen Homolog. (%)	J _κ -G.	V _κ -Gen Lese- rahmen (F./NF.)	V _λ -Gen	V _λ -Gen Homolog. (%)	J _λ -G.	V _λ -Gen Lese- rahmen (F./NF.)
80 S	97,3	3-22	4	F.	λ	O4	100	4	F.	2-14 & 1-3	97,6 & 91,9	3 & 3	F. & NF.
81 S	95,1	5-5/5-18	3	F.	λ	-	-	-	-	2-14	97,6	3	F.
82 S	97,3	6-13	4	F.	λ	O2	98,1	4	NF.	2-14	98,4	3	F.
83 F	94,2	2-2	3	F.	λ	L6	100	3	NF.	2-14	98,8	1	F.
84 S	96,4	-	4	F.	λ	O8/O18	100	2	F.	2-14 & 1-17	98,8 & 97,6	3 & 1	F. & F.
85 S	100	6-19	4	F.	κ	O2	100	5	F.	2-11	100	1	F.
86 S	100	6-13	6	F.	κ	A27 & L12	100	1	F. & NF.	-	-	-	-
87 S	100	3-10	6	F.	κ	L2	100	2	F.	-	-	-	-
88 S	100	3-3	6	F.	κ	L12	100	1	F.	-	-	-	-
89 S	92,8	1-7	6	NF.	λ	A17 & B2	100 & 100	5 & 4	NF. & F.	1-4	98,6	1	F.
90 S	100	3-10	5	F.	κ	L1	99	1	F.				
91 S	96,4	-	4	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,0	3	F.
92 S	90,0	-	6	F.	λ	O8/O18	100	5	NF.	2-14	99,2	3	F.
93 S	96,9	-	6	F.	λ	O2/O12	98,4	4	NF.	2-14	99,2	3	F.
94I	95,9	-	6	F.	λ	B3	100	1	NF.	-	-	-	-
95I	97,2	-	6	F.	λ	A27	97,5	1	NF.	2-14 & 1-22	98,4 & 96,0	3 & 1	F. & F.
97I	97,6	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14 & 5-1	98,8 & 97,1	3 & 1	F. & F.
98I	96,6	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,6 & 98,8	3	F.
100 I	97,1	-	6	F.	λ	A17 & A27	100 & 97,5	2 & 1	NF. & F.	2-14 & 2-14 & 1-22 & 5-2	98,8 & 98,3 & 96,8	3 & 1 & 6 & 3	F. & F. & NF. & NF.
101 I	100	3-3	5	F.	κ	A3/A19 & A27	100 & 97,1	2 & 2	F. & F.	-	-	-	-
103 I	100	3-10	-	F.	λ	B3	100	5	NF.	2-8	99,2	3	NF.
104 I	98,8	6-6	4	F.	λ	L6 & B3	98,3 & 100	4 & 5	NF. & NF.	5-2	100	3	NF.
105 I	99,4	-	6	F.	λ	A27	98,3	4	NF.	2-14	98,0	3	F.
106 A	98,7	-	6	F.	λ	A3/A19	100	1	F.	2-14	98,8	3	F.
107 A	97,3	1-7	4	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,8	3	F.
108 U	99,2	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	99,2	3	F.
109 U	96,9	-	6	F.	λ	A26	94,2	2	F.	2-14	98,2	3	F.
110 U	97,8	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	99,2	3	F.
111 U	96,9	-	6	F.	λ	-	-	-	-	2-14	98,0	3	F.
112 U	99,2	3-9	4	F.	κ	A17	95,4	1	F.	-	-	-	-
113 U	97,7	3-16	4	F.	κ	L9	98,8	1	F.	-	-	-	-
114 U	100	3-3	5	F.	κ	B3	100	5	F.	-	-	-	-

Tabelle 17: V_H3-21-Genumlagerung, V_H- und V_L-Gen-Homologie und Funktionalität der V_H- und V_L-Rearrangements bei V_H3-21-Patienten mit **nicht bekannter** κ/λ Expression. *: Bei Patient 3G konnten nur 2 geklonte Sequenzen amplifiziert werden. PatNr.: Patientennummer. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. Homolog.: Homologie. F.: in frame/innerhalb d. Leserahmens bzw. functional/funktionell. NF.: out of frame/ausserhalb d. Leserahmens bzw. non-functional/nicht funktionell. G. = Gen. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. Homolog.: Homologie. D-G.: Gen für die Diversity Region der Immunglobulin-Schwerkette. J_H-G.: Gen für die Joining Region der Immunglobulin-Schwerkette. V_κ-G.: Gen für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. J_κ-G.: Gen für die Joining Region der Kappa-Leichtkette. V_λ-G.: Gen für die Variable Region der Lambda-Leichtkette. J_λ-G.: Gen für die Joining Region der Lambda-Leichtkette. Die geographische Herkunft des Patienten ist in der entsprechenden Patientennummer mit einem Großbuchstaben erfasst: Deutschland (13G), Schweden (59S), Italien (94I), USA (109U), Finnland (68F) und Australien.(106 A)

Pat Nr.	V _H -Gen-Homolog. (%)	D-G.	J _H -G.	V _H -Lese-rahmen (F./NF.)	V _κ -G.	V _κ -Gen Homolog. (%)	J _κ -G.	V _κ -Gen-Lese-rahmen (F./NF.)	V _λ -G.	V _λ -Gen Homolog. (%)	J _λ -G.	V _λ -Gen Lese-rahmen (F./NF.)
3G	90,0	3-22	5	F.	-	-	-	-	2-1* & 2-14*	98,8 & 98,8	2 & 3	F. & F.
7G	97,8	-	6	F.	L6	100	3	NF.	2-14	98,8	3	F.
10G	97,3	5-24	5	F.	A17	98,9	4	NF.	2-14	99,2	3	F.
11G	98,0	-	2	F.	-	-	-	-	2-14	97,6	3	F.
12G	99,3	6-6	6	F.	-	-	-	-	2-13	99,6	2	F.
14G	100	-	6	F.	L6	96,2	-	F.	2-1	100	2	F.
15G	98,2	-	4	F.	A30	100	4	NF.	2-14	98,8	3	F.
16G	93,4	6-6	5	F.	B3	100	2	NF.	1-17 & 1-1P	97,2 & 95,8	1 & 3	F. & NF.
19G	97,8	-	6	F.	-	-	-	-	2-14	99,6	3	F.
20G	99,7	2-2	6	F.	L23	100	4	NF.	2-17	100	2	F.
24G	98,1	-	6	F.	O8/O18 & L6	100 & 100	4 & 2	NF. & NF.	2-14	99,2	3	F.
25G	94,1	-	5	F.	B3	97,7	2	F.	-	-	-	-
26G	97,6	-	6	F.	-	-	-	-	2-14	98,8	3	F.
28G	98,2	3-9	4	F.	L6	100	1	NF.	2-14	99,2	3	F.
30G	100	6-19	4	F.	L9	99,6	1	NF.	-	-	-	-
31G	97,3	3-10	2	F.	A17	100	4	NF.	2-14	99,2	1	F.
32G	96,9	-	6	F.	L6	100	1	F.	2-14	98,4	3	F.
33G	98,2	-	6	F.	-	-	-	-	2-14	98,8	3	F.
40G	100	3-3	1	F.	L5 & L20	100 & 100	3 & 4	F. & NF.	2-14	96,0	3	F.
52G	96,9	-	6	F.	B3	98,4	1	F.	2-14	96,5	3	F.
57G	96,9	-	6	F.	-	-	-	-	2-14	97,3	3	F.
58G	98,7	-	6	F.	L24 & A27	100 & 100	5 & 4	NF. & NF.	2-14	96,9	2	NF.
66S	97,3	-	6	F.	B3	99,6	1	NF.	2-14	96,9	3	F.

Auf Aminosäureebene zeigten die funktionellen V_{H3-21} -Rearrangements HCDR3-Regionen mit einer medianen Länge von 7 Codons. (5-25 Codons) 50 (56%) V_{H3-21} -Rearrangements, die sich aus Patientenproben aller teilnehmenden Länder zusammensetzen, zeigten eine HCDR3-Region mit einem nicht identifizierbaren D-Gen in Kombination mit einem J_{H6} -Gen. Erstaunlicherweise zeigten 15 Patienten die identische Aminosäureabfolge Asparaginsäure-Alanin-Asparagin-Glycin-Methionin-Asparaginsäure-Valin (kurz: DANGMDV-Motiv) Bei weiteren 21 Patienten zeigte die HCDR3-Region eine sehr hohe Übereinstimmung mit Abweichung in nur 1 Aminosäure vom DANGMDV-Motiv. Darüberhinaus war bei 14 Patienten eine mittlere Übereinstimmung mit 2 oder 3 Abweichungen von der DANGMDV-Sequenz festzustellen.

Von diesen Patienten mit hoher oder mittlerer Übereinstimmung innerhalb der V_{H3-21} Gene, zeigten 74% (n=37) ein mutiertes V_H -Gen mit einer Mutationshäufigkeit zwischen 2,2% und 10%. (Median: 3,4%) Die HCDR3-Sequenzen aller funktionellen V_{H3-21} Gen-Rearrangements sind in **Tabelle 18** dargestellt. Eine Zusammenfassung charakteristischer Merkmale der V_{H3-21} Rearrangements innerhalb der verschiedenen Herkunftsländer sind in **Tabelle 19** und **Tabelle 20** dargestellt.

Es zeigt sich bezogen auf die Gesamtzahl analysierter CLL-Fälle innerhalb eines Herkunftslandes eine Häufung von V_{H3-21} -Fällen in Schweden und Finnland von 10% bzw. 9%, gegenüber 6% im gesamten Kollektiv. Es kann darüber hinaus ein Überwiegen der mutierten Fälle von 63% im gesamten Kollektiv beobachtet werden. Eine ähnliche Verteilung der Häufigkeiten von mutierten V_{H3-21} -Fällen zeigt sich dabei für alle teilnehmenden Herkunftsländer. (Deutschland: 62%, Schweden: 69%, Italien: 55%, USA: 57%, Finnland: 67%, Australien: 50%). Daten zur Leichtkettenexpression waren für 74% der Fälle verfügbar. (67/90 Patienten) Ein Überwiegen der Lambda-Leichtketten-Expression (λ -Expression) zeigt sich sowohl im gesamten Kollektiv mit 63% (57/90) gegenüber 11% (10/90) Kappa-Leichtketten-Expression (κ -Expression) als auch innerhalb der verschiedenen Herkunftsländer. Betrachtet man die Prozentsätze nur bezogen auf die Patienten mit bekannter Leichtkettenexpression so zeigen 85% eine λ -Expression während 15% eine κ -Expression aufweisen. Des Weiteren zeigt sich bei den 90 untersuchten Patienten bei mehr als 50% (55,5%) eine hohe oder mittlere Übereinstimmung in der HCDR3. Ein ähnlich hoher Prozentsatz läßt sich auch innerhalb der untersuchten Herkunftsländer finden. Eine Homologie des B-Zell-Rezeptors mit Übereinstimmungen in der HCDR3 und Umlagerung der $V_{\lambda 2-14}$ -Leichtkette fand sich außerdem bei 51% der untersuchten Patienten, wobei vergleichbare Häufigkeiten innerhalb der einzelnen

Herkunftsländer zu finden waren (Deutschland: 40,5%, Schweden 59,4%, Italien 55,5%, USA: 57%, Finnland 66,6%, Australien 50%.)

Tabelle 18: Aminosäuresequenz der HCDR3- und LCDR3-Regionen bei den CLL-Fällen mit V_H3-21-Genumlagerung. Die HCDR3-Sequenzen, die links dargestellt sind, wurden verglichen mit der am häufigsten vorkommenden HCDR3-Sequenz: **DANGMDV**. D: Asparaginsäure. A: Alanin. N: Asparagin. G: Glycin. M: Methionin. V: Valin. Aminosäuren, die mit der obersten Sequenz identisch sind, werden mit einem Punkt gekennzeichnet. (.) Fehlende Aminosäuren werden mit einem Querstrich gekennzeichnet. (-) Die abweichenden Aminosäuren sind mit der entsprechenden Abkürzung als Großbuchstabe gekennzeichnet: R: Arginin. C: Cystein. Q: Glutamin. E: Glutaminsäure. H: Histidin. I: Isoleucin. L: Leucin. K: Lysin. F: Phenylalanin. P: Prolin. S: Serin. T: Threonin. W: Tryptophan. Y: Tyrosin. Nur die V_λ2-14 LCDR3 Sequenzen werden ebenfalls dargestellt. (auf der rechten Seite) Ein Stern (*) zeigt an, daß der Fall ein von V_λ2-14 abweichendes V_L-Gen benutzt. UPN: Patientenummer (Unique Patient Number). HCDR3: Heavy chain Complementary Determining Region 3. LCDR3: Light chain Complementary Determining Region 3. V_H: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette. V_L: Variable Region der Immunglobulin-Leichtkette. V_H3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. V_λ2-14: Variable Region 2-14 der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. Die geographische Herkunft des Patienten ist in der entsprechenden Patientenummer mit einem Großbuchstaben erfasst: Deutschland (13G), Schweden (59S), Italien (94I), USA (109U), Finnland (68F) und Australien. (106 A)

UPN	V _H	CDR3	V _L	CDR3
13G	V _H 3-21	CARDANGMDV	V _λ 2-14	YYCQVWDSSSDHPWV
26G	V _H 3-21	V _λ 2-14
59S	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
60S	V _H 3-21	V _λ 2-14Q.....
61S	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
62S	V _H 3-21	V _λ 2-14
63S	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
64S	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
65S	V _H 3-21	V _λ 2-14
94I	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....Q.....
97I	V _H 3-21	V _λ 2-14
98I	V _H 3-21	.V.....	V _λ 2-14
105I	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
106A	V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
109U	V _H 3-21	V _λ 2-14
18G	V _H 3-21R.....	V _λ 2-14
24G	V _H 3-21T.R.....	V _λ 2-14GT.....
66S	V _H 3-21R.....	V _λ 2-14L.....
73S	V _H 3-21T.R.....	V _λ 2-14
74S	V _H 3-21T.R.....	V _λ 2-14
75S	V _H 3-21S.G.R.....	V _λ 2-14
108U	V _H 3-21R.....	V _λ 2-14
38G	V _H 3-21G.....	V _λ 2-14G.....
70S	V _H 3-21G.....	V _λ 2-14
92S	V _H 3-21G.....	V _λ 2-14
93S	V _H 3-21G.....	V _λ 2-14G.....Q.....
27G	V _H 3-21O.....	V _λ 2-14
69S	V _H 3-21O.....	V _λ 2-14G.....
110U	V _H 3-21O.....	V _λ 2-14
19G	V _H 3-21S.....	V _λ 2-14
95I	V _H 3-21	.V.L.....	V _λ 2-14D.....
7G	V _H 3-21D.....	V _λ 2-14G.....
6G	V _H 3-21D.....	V _λ 2-14
33G	V _H 3-21A.....	V _λ 2-14
67S	V _H 3-21G.....	V _λ 2-14G.....
68F	V _H 3-21Y.....	V _λ 2-14
58G	V _H 3-21DL.....	V _λ 2-14
32G	V _H 3-21	.A.RS.....	V _λ 2-14NF.....
111U	V _H 3-21GS.....	V _λ 2-14G.....L.....
52G	V _H 3-21SA.....	V _λ 2-14
5G	V _H 3-21O.A.....	V _λ 2-14G.....
100I	V _H 3-21O.A.....	V _λ 2-14G.....
71S	V _H 3-21Q.V.....	V _λ 2-14G.....
72S	V _H 3-21E.V.....	V _λ 2-14
55G	V _H 3-21A.S.....	V _λ 2-14
57G	V _H 3-21K.Q.T.....	V _λ 2-14G.....
76F	V _H 3-21S.R.A.....	V _λ 2-14G.....
77S	V _H 3-21T.R.A.M.....	V _λ 2-14
78S	V _H 3-21S.R.T.....I	V _λ 2-14
79S	V _H 3-21SERS.....	V _λ 2-14G.....
10G	V _H 3-21I.....YND	V _λ 2-14AG.....
11G	V _H 3-21PFDL.....	V _λ 2-14G.....
91S	V _H 3-21QDFDY.....	V _λ 2-14
82S	V _H 3-21YSSSY.....	V _λ 2-14G.....E.....
80S	V _H 3-21SSDSSGDY.....	V _λ 2-14
15G	V _H 3-21GGDDTLFDY.....	V _λ 2-14G.A.L.....
81S	V _H 3-21G.GA.VNVI.....	V _λ 2-14E.....
16G	V _H 3-21SARF.EYSSDP.....	V _λ 2-14
25G	V _H 3-21TSSSLPNWFDV.....	V _λ 2-14
84S	V _H 3-21IGDTSSTSGYSD.....	V _λ 2-14
104I	V _H 3-21VSIAPGTVD.....	V _λ 2-14
4G	V _H 3-21QPP.ITAIGGY.....	V _λ 2-14
30G	V _H 3-21GOWLVLDFDY.....	V _λ 2-14
37G	V _H 3-21EGG.GBGYFDY.....	V _λ 2-14
83F	V _H 3-21GGFCSSTSCPIA.....	V _λ 2-14VYV.....
1G	V _H 3-21SLVQSGVGVIDY.....	V _λ 2-14
35G	V _H 3-21GSLGSPGYFQH.....	V _λ 2-14
107A	V _H 3-21IS.TTGGGRDY.....	V _λ 2-14
3G	V _H 3-21LPFPTYNSGDR.....	V _λ 2-14
12G	V _H 3-21SEYSSSYYYGMDV.....	V _λ 2-14
31G	V _H 3-21G.G.EYFTPDGDL.....	V _λ 2-14Y.....
85S	V _H 3-21VLYSSGWYPPSDP.....	V _λ 2-14
14G	V _H 3-21IWEORLYYYYYGMDV.....	V _λ 2-14G.....
28G	V _H 3-21TPEDVLTGSGPFYD.....	V _λ 2-14
40G	V _H 3-21SD.NY.FWSGYWQYFQH.....	V _λ 2-14QRV.....
86S	V _H 3-21RGVSSSWYASYYYMD.....	V _λ 2-14
87S	V _H 3-21TREVGLLWFGYYGMDV.....	V _λ 2-14
103I	V _H 3-21MYVSGSGSYLREWYSDV.....	V _λ 2-14
114U	V _H 3-21GVLNY.FWSVYYYYGMDV.....	V _λ 2-14
112U	V _H 3-21EGSYALLTGYSLYYFDY.....	V _λ 2-14
113U	V _H 3-21VPLDPS.WGSFGRNSWGYFDY.....	V _λ 2-14
17G	V _H 3-21CDPTGCRKGEQYYYGMDV.....	V _λ 2-14
20G	V _H 3-21ALGYCSSTSCYTGNYYYGMDV.....	V _λ 2-14
90S	V _H 3-21GWAWFPELLSPQSGYYGMDV.....	V _λ 2-14
88S	V _H 3-21DV.ITIFGVVIAATSYYYGMDV.....	V _λ 2-14
101I	V _H 3-21GSGEGYDFWSGYYSVFEYNWFDV.....	V _λ 2-14
8G	V _H 3-21KEDYYDSSGGYVGLGYYYGMDV.....	V _λ 2-14
2G	V _H 3-21AILYYDFWSGYYPFLRDYYGMDV.....	V _λ 2-14

Tabelle 19: Zusammenfassung charakteristischer Merkmale der V_H3-21-Rearrangements getrennt nach den verschiedenen Herkunftsländern. Die Zahlenwerte entsprechen jeweils den **absoluten Häufigkeiten** an V_H3-21-Fällen mit dem jeweiligen Merkmal. Ges.: Gesamtzahl. Deutschl.: Deutschland. SWE: Schweden. Ital.: Italien. Fin.: Finnland. Austr.: Australien. V_H3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. V_H-mut.: V_H-mutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette ist mutiert (Übereinstimmung der V_H mit der Keimbahnsequenz liegt unter 98%). V_H-unmut.: V_H-unmutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette ist unmutiert. (Übereinstimmung der V_H mit der Keimbahnsequenz liegt bei mindestens 98%) κ/λ-Expression: Expression der Kappa-Leichtkette bzw. der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. HCDR3 (0-1): Heavy chain Complementary Determining Regions 3, die in ihrer Aminosäureabfolge in maximal 1 Aminosäure voneinander abweichen. HCDR3 (2-3): Heavy chain Complementary Determining Regions 3, die in ihrer Aminosäureabfolge in 2 oder 3 Aminosäuren voneinander abweichen. V_λ2-14-Gen: Gen für die Variable Region 2-14 der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins.

	Ges.	Deutschl.	SWE	Ital.	USA	Fin.	Austr.
Anzahl V_H3-21-Fälle	90	37	32	9	7	3	2
V_H-mutiert/unmutiert	57/33	23/14	22/10	5/4	4/3	2/1	1/1
≥ 98% V_H-Gen-Homologie (V_H-unmut.)	32	14	10	4	3	1	0
96-98% V_H-Gen-Homologie (V_H-mut.)	41	17	14	4	4	1	1
< 96% V_H-Gen-Homologie (V_H-mut.)	17	6	8	1	0	1	1
κ/λ-Expression	10/57	1/14	5/26	1/8	3/4	0/3	0/2
Hohe Übereinstimmung HCDR3 (0-1)	36	10	16	5	3	1	1
Mittlere Übereinstimmung HCDR3 (2-3)	14	6	5	1	1	1	0
Funktionelles V_λ2-14-Gen	65	26	24	6	4	3	2
Homologie HCDR3 und V_λ2-14	46	15	19	5	4	2	1

Tabelle 20: Zusammenfassung charakteristischer Merkmale der V_H3-21-Rearrangements der verschiedenen Herkunftsländer. Die Zahlenwerte entsprechen **Prozentzahlen** bezogen auf die Gesamtzahl an V_H3-21-Fällen bzw. bezogen auf die Anzahl an V_H3-21-Fällen innerhalb des jeweiligen Herkunftslandes. Zusätzlich in Zeile 2 die prozentuale Häufigkeit von V_H3-21-Fällen unter allen jeweils analysierten CLL-Fällen.

CLL: Chronische Lymphatische Leukämie. Ges.: Gesamtzahl. Deutschl.: Deutschland. SWE: Schweden, Ital.: Italien. Fin.: Finnland. Austr.: Australien. V_H3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. V_H-mut.: V_H-mutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette ist mutiert. (Abweichung von der Keimbahnsequenz um mehr als 2%) V_H-unmut.: V_H-unmutiert/Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette ist unmutiert. (Abweichung von der Keimbahnsequenz um 2% oder weniger) κ/λ-Expression: Expression der Kappa-Leichtkette bzw. einer Lambda-Leichtkette. HCDR3 (0-1): Heavy chain Complementary Determining Regions 3, die in ihrer Aminosäureabfolge in maximal 1 Aminosäure voneinander abweichen. HCDR3 (2-3): Heavy chain Complementary Determining Regions 3, die in ihrer Aminosäureabfolge in 2 oder 3 Aminosäuren voneinander abweichen. V_λ2-14-Gen: Gen für die Variable Region 2-14 der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. Übereinstim.: Übereinstimmung.

	Ges.	Deutschl.	SWE	Ital.	USA	Fin.	Austr.
Prozentuale Verteilung der V_H3-21-Fälle auf die verschiedenen Länder	100	41,1	35,6	10	7,8	3,3	2,2
Häufigkeit von V_H3-21-Fällen bezogen auf Gesamtzahl an jeweils analysierten CLL-Fällen	6	5	10	5	3	9	3
V_H-mutiert/unmutiert	63/36	62/38	69/31	55/45	57/43	67/33	50/50
≥ 98% V_H-Gen-Homologie (V_H-unmut.)	35	37,8	31,25	44	42,85	33,3	0
96-98% V_H-Gen-Homologie (V_H-mut.)	45,5	46	43,75	44	57,25	33,3	50
< 96% V_H-Gen-Homologie (V_H-mut.)	19,5	16,2	25	12	0	33,3	50
κ/λ Expression	11/63,3	2,7/37,8	15,6/81,2	12/88	43/57	0/100	0/100
Hohe Übereinstim. HCDR3 (0-1)	40	27	50	55	43	33,3	50
Mittlere Übereinstim. HCDR3 (2-3)	15,5	16,2	15,6	12	14,3	33,3	0
Funktionelles V_λ2-14 Gen	72,2	70,3	75	66,6	57	100	100
Homologie HCDR3 und V_λ2-14	51	40,5	59,4	55,5	57	66,6	50

3.2. V_L-Gen-Rearrangements (Umlagerung der variablen Leichtketten)

Bei allen der 90 untersuchten V_H3-21-Fälle konnte mindestens 1 V_L-Gen-Rearrangement detektiert werden. Insgesamt ließen sich 89 V_κ- (26 funktionell und 63 nicht funktionell) sowie 88 V_λ-Rearrangements (78 funktionell und 10 nichtfunktionell) amplifizieren und sequenzieren. 68 der 90 Fälle zeigten dabei V_κ-Rearrangements und 77 Fälle zeigten V_λ-Rearrangements. Dabei fanden sich bei 55 Fällen sowohl V_κ- als auch V_λ-Rearrangements. Die V_L-Gen-Sequenzdaten sind ebenso wie die V_H-Gen-Sequenzdaten in **Tabelle 16** und **Tabelle 17** dargestellt.

3.2.1 V_λ-Gen-Rearrangements

Ein einzelnes V_λ-Gen-Rearrangement wurde in 68 Fällen detektiert. (63 funktionell und 5 nicht-funktionell) 8 Patienten zeigten ein doppeltes V_λ-Rearrangement. Davon zeigten 3 je ein funktionelles und ein nicht-funktionelles Rearrangement. Bei den verbleibenden 5 Fällen waren beide V_λ-Rearrangements potentiell funktionell umgelagert. Ein Patient (Patient: 100 I) zeigte 2 funktionelle und 2 nicht-funktionelle V_λ-Rearrangements.

3.2.2. V_κ-Gen-Rearrangements

Aus den 89 V_κ-Gen-Rearrangements die von 68 Patienten amplifiziert wurden, waren 26 funktionell und 63 nicht funktionell umgelagert. Die Mehrheit der Rearrangements war dabei unmutiert und nur 8 der Rearrangements trugen somatische Mutationen, mit einer medianen Mutationsrate von 2,9%. (2,3-5,8%) Das am häufigsten umgelagerte V_κ-Gen war V_κB3 (n=16) und V_κA27 (n=12). Die J-Segmente J_κ4 und J_κ1 waren die am häufigsten umgelagerten J_κ-Gene, die in 31 bzw. 19 Rearrangements genutzt wurden. Bei 13 Patienten ließen sich nur V_κ-Gen-Rearrangements finden, von denen 10 potentiell funktionell umgelagert waren. Bei den übrigen 55 Patienten, die alle V_λ-Rearrangements umgelagert hatten, zeigten sich 73 V_κ-Gen-Rearrangements (15 potentiell funktionell und 58 nicht-funktionell), einschließlich 16 Fälle mit 2 und 1 Fall mit 3 umgelagerten V_κ-Allelen.

3.2.3. Funktionalität der Leichtketten-Rearrangements

Wenigstens 1 funktionell umgelagertes V_L -Gen-Rearrangement konnte in 82 der 90 untersuchten Fälle gezeigt werden. Die Expression von Leichtketten war bei 67 Fällen bekannt. 10 Fälle exprimierten dabei κ -Leichtketten während 57 Fälle λ -Leichtketten exprimierten. In den verbleibenden 23 Fällen waren die Daten zur Leichtkettenexpression nicht verfügbar. Innerhalb der 10 Fälle mit κ -Leichtkettenexpression zeigten alle funktionell umgelagerte V_κ -Rearrangements und von den 57 Fällen mit bekannter λ -Leichtkettenexpression konnten bei 52 Fällen funktionelle V_λ -Rearrangements sequenziert werden. In den 23 Fällen ohne bekannte Leichtkettenexpression zeigten 16 Fälle ein funktionelles V_λ -Rearrangement, 1 Fall hatte ein funktionelles V_κ -Rearrangement, 4 Fälle zeigten sowohl funktionelle V_κ - als auch funktionelle V_λ -Rearrangements und bei 2 Fällen konnte kein funktionelles Rearrangement amplifiziert werden.

3.2.4. V_L -Gen-Mutationsstatus

Die Mehrheit der V_κ -Gene war unmutiert. Nur 8 von 89 Rearrangements trugen somatische Mutationen mit einer medianen Mutationsrate von 2,9%. (2,3%-5,8%) Somatische Mutationen konnten bei 20 der 88 V_λ -Rearrangements, mit einer medianen Mutationshäufigkeit von 3,4% (2,4%-8,1%) identifiziert werden.

3.2.5. V_L/J_L -Genumlagerung

Das am häufigsten umgelagerte V_λ -Gen war $V_{\lambda 2-14}$, das bei 65 Rearrangements verwendet wurde, und somit 72% der V_λ -Rearrangements entsprach, gefolgt von $V_{\lambda 2-1}$ das bei 4 Rearrangements detektiert wurde. (4%) Innerhalb der V_λ -Rearrangements wurde das $J_{\lambda 3}$ -Gen bei 68 Rearrangements gefunden (76%). $J_{\lambda 1}$ und $J_{\lambda 2}$ fanden sich in 10 bzw. 6 Rearrangements. Die Kombination $V_{\lambda 2-14}/J_{\lambda 3}$ fand sich in 61 Fällen aus allen teilnehmenden Ländern. (Deutschland $n=24$, Schweden $n=24$, Italien $n=5$, USA $n=4$, Australien $n=2$ und Finnland $n=2$) Die Leichtketten-CDR3-Regionen der $V_{\lambda 2-14}$ -Patienten hatten eine mediane Länge von 12 Codons (11-12) und zeigten eine hohe Sequenzhomologie in den Fällen mit funktionell umgelagertem Rearrangement. Die häufigste LCDR3-Aminosäuresequenz, die in 45 Fällen detektiert werden konnte, war Glutamin-Valin-Tryptophan-Asparaginsäure-Serin-(Serin/Glycin)-Serin-Asparaginsäure-Histidin-Prolin-Tryptophan-Valin (kurz: QVWDS(S/G)SDHPWV), wobei als 6.

Aminosäure entweder Serin (S) oder Glycin (G) identifiziert werden konnte. In 14 weiteren Rearrangements zeigte sich eine weitere Aminosäureabweichung von einer dieser Sequenzen und 2 oder 3 zusätzliche Abweichungen wurden in weiteren 4 Fällen gefunden. Die Aminosäuresequenzen der L_{CDR3} der V_λ2-14-Rearrangements sind in **Tabelle 18** dargestellt.

3.3. Kombinierte V_H- und V_L-Gen Benutzung

Die spezielle Kombination von V_H3-21/D/J_H6 zusammen mit V_λ2-14/J_λ3 fand sich in 51% der Patienten (n=46), wobei 34 Fälle eine sehr hohe Übereinstimmung in der H_{CDR3}- und L_{CDR3}-Sequenz und 12 Patienten eine ebenfalls sehr hohe Übereinstimmung in der L_{CDR3}-Sequenz und eine mittlere Übereinstimmung in der H_{CDR3}-Sequenz zeigten. Diese spezielle Immunglobulinsequenzkombination wurde bei Patienten aus allen 6 eingeschlossenen Ländern gefunden. Dabei waren 19 Fälle aus Schweden, 15 aus Deutschland, 5 aus Italien, 4 aus den USA, 2 aus Finnland und 1 Fall aus Australien mit dieser erstaunlichen Übereinstimmung in der V_H- und V_L-Sequenz nachzuweisen. Tabellarisch ist dieser Zusammenhang neben anderem in **Tabelle 19** und **20** dargestellt.

3.4. Analyse des Kappa-Deleting-Element-Rearrangements (KDE-Rearrangement)

42 der Fälle mit bekannter λ-Leichtkettenexpression wurden auf das Vorhandensein eines umgelagerten Kappa-deleting-elements (KDE), sowie das Vorliegen einer Keimbahnkonfiguration des KDE untersucht. Die Umlagerung des KDE, entweder an eine J_κ-C_κ-Intron-RSS (Intron-KDE in **Tabelle 21**; RSS=Recombination Signal Sequence) oder an eine V_κ-RSS (V_κ-KDE in **Tabelle 21**; Vergleiche jeweils auch **Abb. 3**) konnte in 41 von 42 Fällen (98%) detektiert werden. (Ausnahme Patient 27G) Bei 38% gelang dies bei einem Allel, bei 60% bei beiden Allelen. Der Nachweis eines nicht funktionellen V_κ-Gen-Rearrangements zusammen mit einem oder zwei KDE-Rearrangements konnte in 15 bzw. 16 Patienten gezeigt werden. Ein PCR-Produkt mit Keimbahnkonfiguration des KDE wurde bei allen bezüglich des KDE-Rearrangements analysierten Proben gefunden. Die Daten der KDE-Analyse sind in **Tabelle 21** dargestellt.

Tabelle 21: Übersicht über die beiden alternativen KDE-Rearrangements (**V_κKDE-Rearrangement** und **J_κ-C_κ-Intron-RSS-KDE-Rearrangement**) bei λ-exprimierenden V_H3-21-Patienten. *: Bei Patient 4G konnten nur 2 geklonte Sequenzen amplifiziert werden. *F.: innerhalb des Leserahmens bzw. funktionell/functional, NF.: außerhalb des Leserahmens bzw. nicht funktionell/non-functional. Der Querstrich (-) bezeichnet, dass das jeweilige Rearrangement bzw. Leserahmen nicht bestimmt werden konnte. Die geographische Herkunft des Patienten ist in der entsprechenden Patientennummer (**V_H3-21 Pat.-Nr.**) mit einem Großbuchstaben erfasst: Deutschland (1G), Schweden (59S), Finnland (68F). **V_H3-21:** Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. **V_κ-Gen:** Gen für die Variable Region der Kappa-Leichtkette des Immunglobulins. **V_λ-Gen:** Gen für die Variable Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins. KDE: Kappa-Deleting-Element/Kappa-Leichtketten-deletierendes Element. **V_κKDE:** Kurzform für V_κKDE-Rearrangement/Kombinationssequenz aus Variable Region der Kappa-Leichtkette und KDE, die durch Umlagerung des KDE an eine Recombination Signal Sequence (RSS), die sich in unmittelbarer Nähe der V_κ-Gen-Region befindetet, entsteht. **J_κ-C_κ-Intron-KDE:** Kurzform für J_κ-C_κ-Intron-RSS-KDE-Rearrangement/Kombinationssequenz, die durch Umlagern des KDE an an eine Intron-Recombination Signal Sequenz (Intron-RSS), die zwischen der Joining Region der Kappa-Leichtkette (J_κ) und der Constant Region der Kappa-Leichtkette (C_κ) des Immunglobulins liegt, entsteht.

V_H3-21 Pat.-Nr.	V_κ-Gen	V_κ-Gen Leserahmen: F./NF.*	V_λ-Gen	V_κKDE	J_κ-C_κ-Intron-KDE
1G	L12	NF.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
2G	-	-	1-22	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
4G*	A1	NF.	2-1*	V _κ KDE	-
5G	B3	F.	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
6G	O2/O12	NF.	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
13G	O2/O12 & B3	NF. & F.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
17G	O8/O18	NF.	1-17 & 2-1	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
18G	-	-	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
27G	-	-	2-14	-	-
35G	A27	NF.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
37G	-	-	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
38G	O8/O18	NF.	2-14	V _κ KDE	-
55G	L1 & A1 & A27	NF. & F. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
59S	O8/O18 + A17	NF. & F.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
60S	A1 & B3	NF. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
61S	O4	NF.	2-14 & 2-11	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
62S	O2	NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
63S	A18	NF.	-	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
64S	A27	NF.	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
65S	A2	NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
67S	O2/O12 & B3	NF. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
68F	A20 & L6	NF. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
69S	-	-	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
70S	-	-	2-14	2 x V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
71S	A27 & B3	NF. & NF.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
72S	L9 & B3	NF. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
73S	O8/O18 & B3	NF. & NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
74S	A18 & L12	NF. & NF.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
75S	B3	NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
76F	O8/O18	NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
77S	A3/A19	NF.	2-14	-	2 x J _κ -C _κ -Intron-KDE
78S	-	-	3-4	2x V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 21

V_H3-21 Pat.-Nr.	V_κ-Gen	V_κ-Gen Leserah- men: F./NF.*	V_λ-Gen	V_κKDE	J_κ-C_κ-Intron- KDE
79S	O8/O18	NF.	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
80S	O4	F.	2-14 & 1-3	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
81S	-	-	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
82S	O2/O12	NF.	2-14	-	J _κ -C _κ -Intron-KDE
83F	L6	NF.	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
89S	A17&B2	NF. & F.	1-4		J _κ -C _κ -Intron-KDE
91S	-	-	2-14	V _κ KDE	J _κ -C _κ -Intron-KDE
92S	O8/O18	NF.	2-14	2x V _κ KDE	-
93S	O2/O12	NF.	2-14	-	2x J _κ -C _κ -Intron-KDE

3.5. Beziehung zu anderen prognostischen Markern

Für 43 Patienten wurde das CD38-Expressionsniveau bestimmt. Es wurde anhand der Verteilung der Fälle ein CD38-Cut-Off-Level von 20% festgelegt. Bei 20 Fällen (12 mutiert und 8 unmutiert) lag das CD38-Expressionsniveau über 20%, wohingegen 23 Fälle (14 mutiert und 9 unmutiert) ein CD38-Expressionsniveau von weniger als 20% zeigten. (Dargestellt in **Abb. 7**) Die ZAP-70 Expression wurde bei 10 Patienten beurteilt, von denen 7 Patienten (5 V_H-mutiert und 2 V_H-unmutiert) mehr als 20% ZAP-70⁺-Zellen aufwiesen, während die restlichen 3 Fälle (2 V_H-mutiert und 1 V_H-unmutiert) weniger als 20% ZAP-70⁺-Zellen zeigten (Dargestellt in **Abb. 8**). Zytogenetische Daten wurden für 55 Fälle (34 V_H-mutiert und 21 V_H-unmutiert) erhoben. Die Deletion-13q war dabei die häufigste chromosomale Aberration (n=25, 18 V_H-mutiert und 7 V_H-unmutiert), gefolgt von der Deletion-11q, (n=15; 8 V_H-mutiert und 7 V_H-unmutiert) Deletion-17p (n=5; 3 V_H-mutiert und 2 V_H-unmutiert) und der Trisomie 12. (3 V_H-mutiert) In 7 Fällen konnte keine der untersuchten zytogenetischen Aberrationen detektiert werden.

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen in der V_H -mutierten und V_H -unmutierten Gruppe. In Klammern (%) die prozentuale Verteilung der Aberrationen bezogen auf die Zahl aller zytogenetisch analysierten Patienten (n=55) und bezogen auf die Patientenzahl in der V_H -mutierten (n=34) bzw. V_H -unmutierten Gruppe. (n=21). V_H -mutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette zeigt weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H -unmutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette zeigt mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. Deletion-13q: Deletion am langen Arm von Chromosom Nummer 13. Trisomie-12q: Trisomie am langen Arm von Chromosom Nummer 12. Deletion-11q : Deletion am langen Arm von Chromosom Nummer 11. Deletion 17p: Deletion am kurzen Arm von Chromosom Nummer 17. Zytogenet. Aberrationen ges.: Zytogenetische Aberrationen gesamt.

	Alle zytogenetisch analysierten Patienten 55 (100%)	V_H-Homologie <98% / V_H-mutiert 34 (62%)	V_H-Homologie \geq 98% V_H-unmutiert 21 (38%)
Aberration			
Deletion-13q	25 (45%)	18 (53%)	7 (33%)
Trisomie-12q	3 (5%)	0 (0%)	3 (14%)
Deletion-11q	15 (27%)	8 (24%)	7 (33%)
Deletion-17p	5 (9%)	3 (9%)	2 (10%)
Deletion-17p- oder-11q	20 (36%)	11 (32%)	9 (43%)
Zytogenet. Aberrationen ges.	48 (87%)		

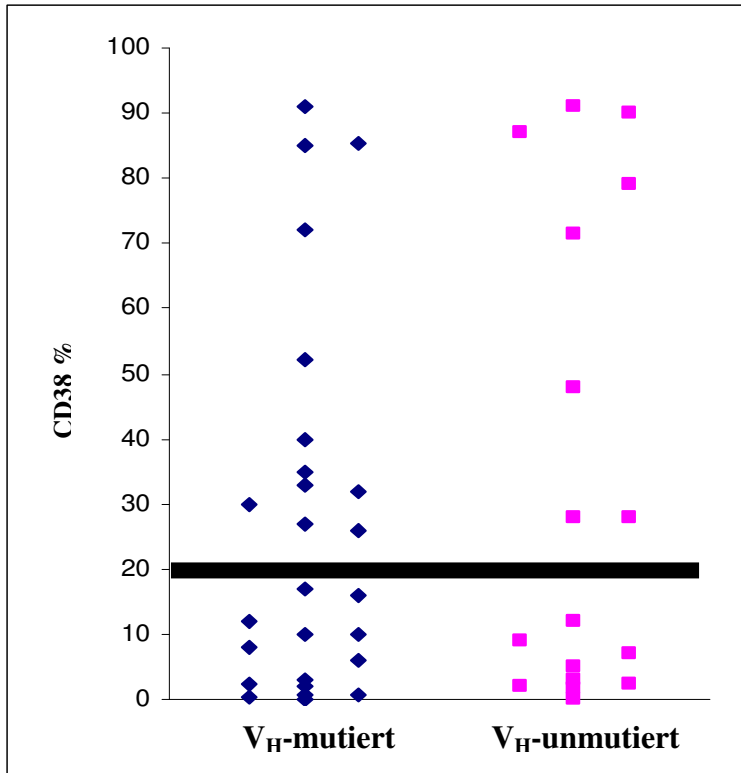


Abb. 7: CD38 bei V_H-3-21-CLL-Fällen: CD38-Expression bei 26 V_H-mutierten und 17 V_H-unmutierten V_H3-21-CLL-Patienten. V_H-mutierte und V_H-unmutierte Fälle geteilt in 2 Gruppen auf der x-Achse aufgetragen. (V_H-mutierte Fälle dargestellt als blaue Rauten. V_H-unmutierte Fälle dargestellt als rosa Quadrate) Auf der y-Achse aufgetragen die prozentuale CD38-Expression in %. Cut-Off-Level der CD38-Expression festgelegt auf 20%, dargestellt durch die breite horizontale schwarze Linie. V_H-mutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-unmutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. CLL: Chronische Lymphatische Leukämie. CD38: Cluster of Differentiation 38.

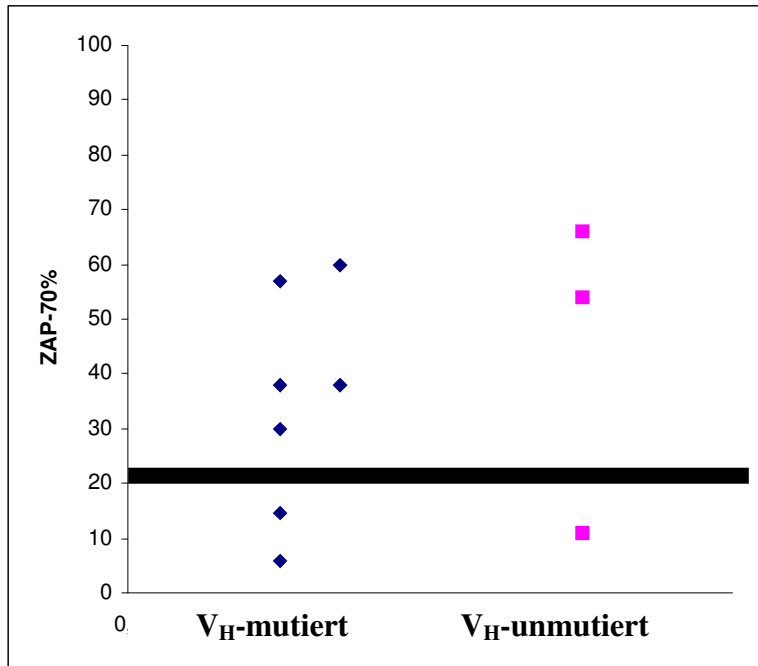


Abb. 8: ZAP-70 bei V_H-3-21-CLL-Fällen: ZAP-70-Expression bei 7 V_H-mutierten und 3 V_H-unmutierten V_H3-21-CLL-Fällen. V_H-mutierte und V_H-unmutierte Fälle geteilt in 2 Gruppen auf der x-Achse aufgetragen. (V_H-mutierte Fälle dargestellt als blaue Rauten. V_H-unmutierte Fälle dargestellt als rosa Quadrate) Auf der y-Achse aufgetragen die ZAP-70 Expression in %. Cut-Off-Level entsprechend Crespo et. al (21) bei 20%-ZAP-70⁺-CLL-Zellen, dargestellt als breite, schwarze, horizontale Linie. V_H-mutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-unmutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette. CLL: Chronische Lymphatische Leukämie ZAP-70: Zeta-associated-protein 70. et al.: et alii/und andere.

3.6. Überlebensanalysen

Überlebensdaten waren verfügbar für 64 Patienten, davon 32 aus Schweden, 14 aus Deutschland, 9 aus Italien, 4 aus den USA, 3 aus Finnland und 2 aus Australien. Das mediane Gesamtüberleben betrug 88 Monate. Zwischen V_H-mutierten (41 Fälle) und V_H-unmutierten V_H3-21-Patienten (23 Fälle) konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben festgestellt werden. Das mediane Überleben betrug dabei 79 Monate für die V_H-mutierte Patientengruppe, wohingegen das mediane Überleben in der V_H-unmutierten Gruppe nicht erreicht wurde. (log-rank test, p-Wert = 0,17). Die Überlebensdaten sind in **Abb. 9** dargestellt.

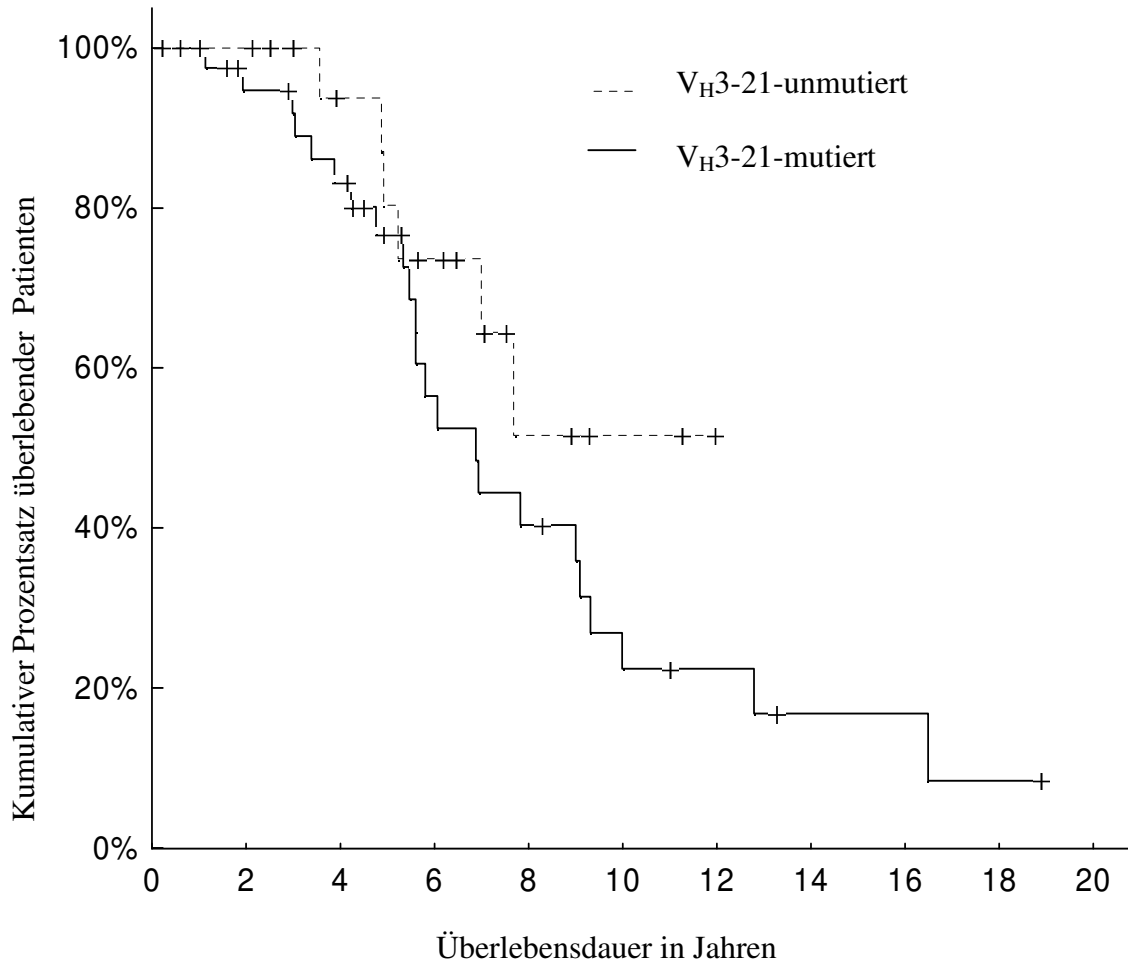


Abb. 9: Kaplan-Meier-Überlebenskurven bei V_H3-21-Patienten in Abhängigkeit vom V_H-Mutationsstatus: Auf der x-Achse aufgetragen die Überlebensdauer in Jahren, auf der y-Achse der kumulative Prozentsatz überlebender Patienten in Prozent getrennt für V_H3-21-mutierte und -unmutierte Patienten. V_H-mutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-unmutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette.

Ausserdem zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben im Vergleich von Patienten mit sehr hoher Übereinstimmung der HCDR3 (definiert als Patienten mit 0-1 Aminosäureabweichung: insgesamt 30 Patienten) und jenen Patienten bei denen keine Übereinstimmung in der HCDR3 (insgesamt 34 Patienten) vorlag. (104 vs. 70 Monaten, p-Wert = 0,32). Dieser Zusammenhang ist graphisch in **Abb. 10** dargestellt.

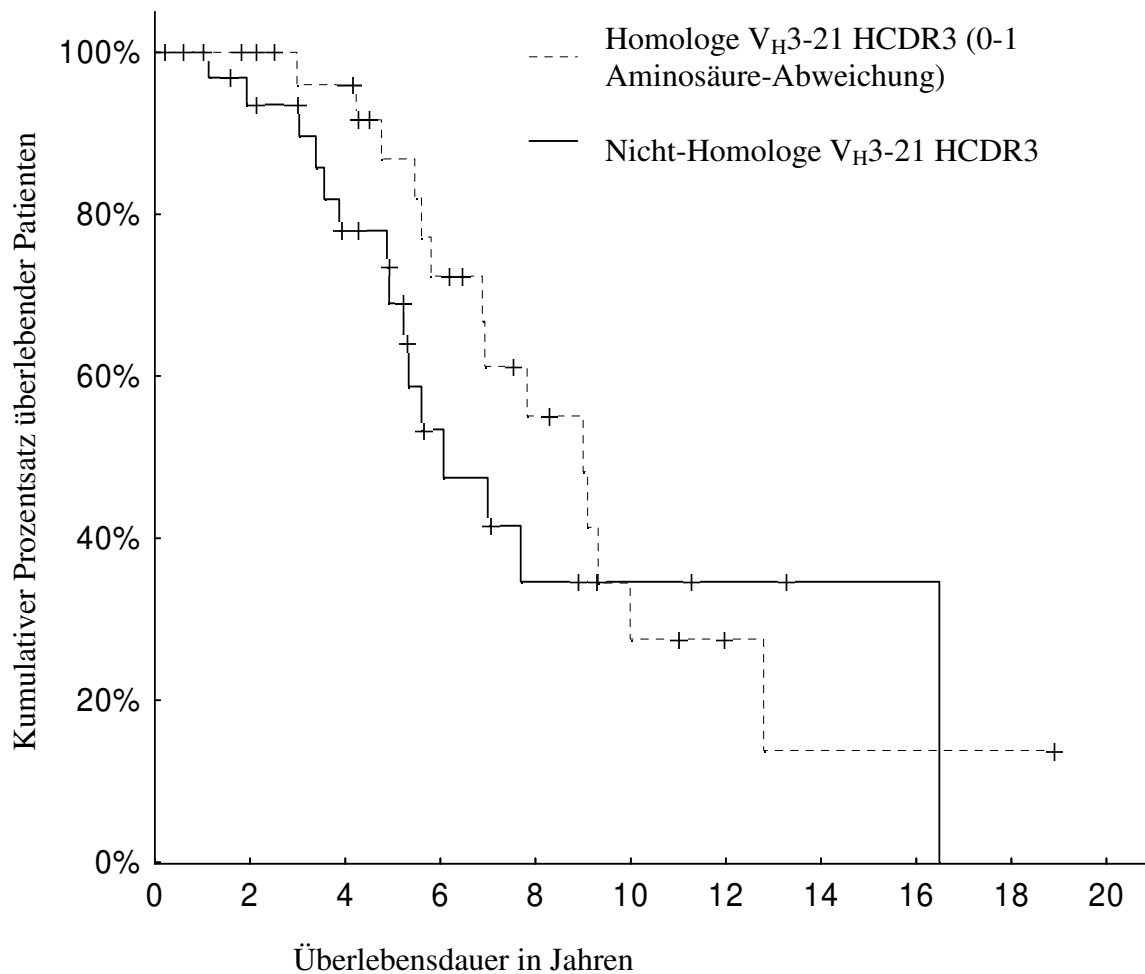


Abb 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurven von V_H3-21-Patienten in Abhängigkeit von der HCDR3-Homologie. Auf der x-Achse aufgetragen die Überlebensdauer in Jahren, auf der y-Achse der kumulative Prozentsatz überlebender Patienten in Prozent getrennt für V_H3-21-Patienten mit und ohne homologe HCDR3-Region. Dabei unterscheiden sich die Fälle in der Gruppe mit homologer HCDR3 in maximal 1 Aminosäure. HCDR3: Heavy chain Complementary Region 3. V_H-mutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt weniger als 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-unmutiert: Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (V_H) zeigt mindestens 98% Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz. V_H-3-21: Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette.

Ebenfalls ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit kurzer (41 Fälle) und langer HCDR3-Region (23 Fälle: 92 vs. 65 Monate p-Wert = 0,60) oder Umlagerung des $V_{\lambda}2-14$ Gens (48 Fälle) bzw. Umlagerung anderer V_L -Gene. (16 Fälle: 85 vs. 77 Monate, p-Wert = 0,81) Auch die Wahl anderer Grenzen zur Definition der HCDR3-Homologie und zwar nur 0, 0-2, 0-3 Aminosäurenabweichungen von der DANGMDV-Motiv-Sequenz wurden im Hinblick auf Unterschiede im Gesamtüberleben untersucht, ohne dass sich hierbei ein signifikanter Unterschied im Überleben zeigen ließ.

4. Diskussion

4.1. Bemerkenswerte Übereinstimmungen in der B-Zell-Rezeptor-Struktur

In Vorarbeiten wurde von der kooperierenden schwedischen Arbeitsgruppe eine das V_{H3-21} -Gen umlagernde CLL-Patientengruppe identifiziert, deren Immunglobulingenstruktur erstaunliche Besonderheiten zeigt und die eine besonders ungünstige klinische Prognose aufweist. (122, 123) Um die Merkmale des Immunglobulins und die prognostische Bedeutung der V_{H3-21} -Umlagerung weiter zu beleuchten wurde in Kooperation mit weiteren Zentren die V_{H3-21} -Fallsammlung um Material aus insgesamt 6 verschiedenen Ländern aus verschiedenen Teilen der Welt, nämlich Deutschland, Schweden, Italien, USA, Finnland und Australien erweitert. In Übereinstimmung mit vorangehenden Arbeiten konnte bei Patienten aller teilnehmenden Länder unabhängig von ihrer Herkunft eine charakteristische Immunglobulin-Gen-Rearrangement-Struktur gezeigt werden. Ein großer Teil der V_{H3-21} -CLL-Patienten (56%) zeigte dabei Gen-Rearrangements mit sehr kurzen HCDR3-Regionen (7 Aminosäuren), die untereinander hochgradige Übereinstimmungen aufwiesen. Viele der HCDR3-Regionen zeigten dabei das Aminosäuremotiv, DANGMDV. Des Weiteren war bei einer Mehrheit der V_{H3-21} -Patienten (73%) in der Immunglobulin-Leichtkette eine bevorzugte Umlagerung des $V_{\lambda 2-14}$ -Gens (Benennung nach Genbank Nomenklatur) festzustellen. Darüberhinaus fand sich ebenfalls eine hohe Homologie der LCDR3-Regionen bei der Mehrheit (91%) der $V_{H3-21}/V_{\lambda 2-14}$ -Patienten mit der charakteristischen Aminosäureabfolge: Glutamin-Valin-Tryptophan-Asparaginsäure-Serin-(Serin/Glycin)-Serin-Asparaginsäure-Histidin-Prolin-Tryptophan-Valin. (kurz: QVWDS(S/G)SDHPWV) Die Kombination homologer HCDR3- und LCDR3-Regionen ließ sich erstaunlicherweise bei Proben aus allen eingeschlossenen Ländern finden. Folglich lässt sich anhand der erhobenen Daten vermuten, dass diese klar umschriebene B-Zell-Rezeptorstruktur der V_{H3-21} -benutzenden CLL-Fälle sehr wahrscheinlich ein weltweit verbreitetes Phänomen darstellt. Dies wird weiter gestützt durch eine unlängst veröffentlichte Arbeit an V_{H3-21} -umlagernden CLL-Fällen aus dem Mittelmeerraum, in der sich ebenfalls Fälle mit der gleichen Immunglobulingen-Struktur finden ließen. (45) Die große Übereinstimmung der B-Zell-Rezeptoren, die sich bei den V_{H3-21} -CLL-Fällen

finden lässt, spricht dafür, daß Mechanismen der Antigenselektion an der Entwicklung der CLL durch Erkennung bestimmter gemeinsamer Antigenepitope beteiligt ist. Diese Hypothese stützt sich dabei auf folgende Erkenntnisse. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei verschiedenen CLL-Patienten 2 gleiche V_HDJ_H -Rearrangements zufällig auftreten ist aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten zwischen den V-, D- und J-Segmenten äußerst gering und liegt bei $1/51$ V-Segmente \times $1/27$ D-Segmente \times $1/6$ J-Segmente = $1/8262$. In Kombination mit einem spezifischen V_L -Gen ist die Wahrscheinlichkeit nochmals um ein Vielfaches geringer. Dies kann mit $1/8262 \times 1/33 \times 1/77$ ($1/V_{\lambda}J_{\lambda}$) = $1/1,9$ Millionen beziffert werden. Wenn die Möglichkeit zur Variation bei der Zusammenfügung der Segmente miteingerechnet wird, wird die Wahrscheinlichkeit weiter auf weniger als 10^{-12} reduziert. Die Tatsache, dass sehr ähnliche $V_H3-21/V_{\lambda}2-14$ -Rearrangements bei einer großen Anzahl von Patienten in verschiedenen Ländern gefunden werden können, stärkt die Theorie der Antigenselektion weiter, da es als äußerst unwahrscheinlich einzuschätzen ist, dass diese Beobachtung auf zufällige Geschehnisse zurückzuführen ist. Eine der derzeitigen Theorien postuliert, dass das Antigen die V_H3-21 -B-Zelle möglicherweise noch vor der leukämischen Transformation zur Proliferation mit folglich klonaler Vermehrung und Hinzugewinn weiterer genetischer Ereignisse stimuliert. (15) Somit wird die Wahrscheinlichkeit für den Erwerb, von im Hinblick auf eine maligne Entartung, „gefährlichen“ Mutationen erhöht. Es bestehen Hinweise darauf, dass Antigenstimulation zusammen mit der Interaktion mit akzessorischen Zellen und deren Zytokinen einen unterstützenden Faktor darstellen, der die Proliferation von CLL-Zellen fördert und sie vor Apoptose schützt. Die Vermutung liegt nahe, dass sich die Ausprägung solcher oder ähnlicher Mechanismen in den verschiedenen Subgruppen unterscheidet, und so zu Unterschieden im klinischen Verlauf zwischen den einzelnen Gruppen führt. (15) Dies wirft die Frage nach der Art und Herkunft der stimulierenden Antigene auf. Obwohl diese „potentiellen“ Antigene bislang unbekannt sind vermuten sowohl ältere (5, 7, 119) als auch unlängst veröffentlichte Arbeiten, (56) dass möglicherweise Autoantigene in diesen Prozess involviert sein könnten. Bei etwa 50% der CLL-Fälle ließ sich die Produktion von autoreaktiven Antikörpern nachweisen. Es ließ sich dabei weiterhin zeigen, daß V_H -unmutierte CLL-Zellen hochgradig polyreaktive B-Zell-Rezeptoren produzieren während dies bei den meisten V_H -mutierten CLL-Zellen nicht zu beobachten war. (56) Durch Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor wird möglicherweise eine permanente Stimulation der V_H -unmutierten CLL-Zellen vermittelt (14, 124), die zur Weitergabe intrazellulärer

Signale über (unter anderem) die Proteine ZAP-70 oder SYK (Spleen Tyrosin Kinase) führen könnte. (12, 13, 129) In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist die Kapazität des B-Zell-Rezeptors zur Übermittlung intrazellulärer Signale bei V_H -unmutierten CLL-Zellen verglichen mit V_H -mutierten CLL-Zellen erhöht. (12, 13, 80, 124, 129) Nur in etwa 50% der Fälle führt eine in vitro Bindung von IgM-Antikörpern an den B-Zell-Rezeptor zur Übermittlung von Signalen an den Zellkern. (15) Die Ursache solcher unterschiedlicher Reaktionen auf die Bindung an den B-Zell-Rezeptor sind in der Zukunft weiter zu beleuchten.

Als Telomere bezeichnet man die Endstrukturen von Chromosomen, die aus einer repetitiven DNA-Sequenz [(Thymin-Thymin-Adenin-Guanin-Guanin-Guanin), kurz: (TTAGGG)_n] zusammengesetzt und an spezifische Proteine gebunden sind. (4, 96) Sie schützen die DNA vor Degradierung, verhindern End-zu-End Fusionen und besitzen beim Menschen eine durchschnittliche Länge von 5-15 Kilobasen. Bei jedem Zellzyklus verkürzen sie sich um ca. 100-200 Basenpaare, da die DNA-Polymerase den fehlenden DNA-Strang nicht vollständig replizieren kann. (26, 54, 81) Somit dient die Telomerlänge als Indikator für die Proliferationsgeschichte einer Zelle. (55) Dem Abbau der Telomere wirkt ein Enzym namens Telomerase entgegen, welches TTAGGG-Sequenzen wiederholt an die Chromosomenenden anfügt. (95) Tumorzellen weisen häufig kürzere Telomere auf als Kontrollzellpopulationen gleichen Alters. Dabei konnten sowohl in vielen soliden Tumoren (36) als auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen (6, 35, 98) im Vergleich kürzere Telomere nachgewiesen werden. V_H -unmutierte CLL-Zellen zeigen kürzere Telomere als V_H -mutierte CLL-Zellen, was für eine ebenfalls längere Proliferationsgeschichte der V_H -unmutierten CLL-Zellen verglichen mit V_H -mutierten CLL-Zellen spricht. (25) Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Patienten mit kurzen Telomeren häufiger prognostisch ungünstige zytogenetische Aberrationen wie beispielsweise die Deletionen-11q oder -17p aufweisen und dass kürzere Telomere mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Ausserdem zeigte sich, dass die Telomerlänge invers korreliert ist mit weiteren prognostisch bedeutsamen Markern wie dem ZAP-70- und CD38-Expressionsstatus. (74) Eine mögliche Interpretation dieser Zusammenhänge ist, dass die längere Proliferationsgeschichte von Patienten mit kurzen Telomeren die Wahrscheinlichkeit für das Erwerben genetischer Veränderungen erhöht und der Zugewinn bestimmter ungünstiger Aberrationen zu einem Proliferationsvorteil führt und so die Selektion bestimmter B-Zell-Klone bewirkt. Ob Antigenstimulation dabei

aber zur Aufrechterhaltung einer klonalen Expansion zwingend notwendig ist, ist bislang nicht geklärt, da auch bei normalen B-Zellen ein niedriges Niveau an BCR-vermittelten Signalen zu finden ist (9, 93) und ein antigenunabhängiger, über den BCR-Signalweg vermittelter Stimulationstrigger durch andere genetische Läsionen durchaus denkbar erscheint. Trotzdem ist es sicher möglich, dass zum Beispiel latente Viren oder Kommensalbakterien über den B-Zell-Rezeptor zu einer wiederkehrenden Stimulation von bestimmten B-Zell-Klonen und somit durch entsprechende Infektion und Stimulation zum Auftreten einer chronisch lymphatischen Leukämie führen könnten, wie dies beispielsweise bei *Helicobacter-pylori*-assoziierten MALT-Lymphomen nachgewiesen werden konnte. (11) Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der ursächlichen Antigene und der Bedeutung von Mechanismen der Antigenstimulation in der Pathogenese der CLL sind notwendig. Ein weitere CLL-Subgruppe mit einer definierten VDJ-Struktur (unmutiertes V_H -Gen, lange HCDR3, Umlagerung von J_H6) mit zum Teil identischen V_H - und V_L -Rearrangements und das häufigste unmutiert umgelagerte V_H -Gen überhaupt ist das V_H1-69 -Gen, dessen gehäuftes Auftreten bei der B-CLL auf möglicherweise weitere stimulierende Antigene hinweist und die Theorie von Antigenselektionsmechanismen bei der CLL weiter untermauert. (103, 126) Dies wird weiter durch die Tatsache bekräftigt, daß unmutierte V_H1-69 -CLL-Fälle in B-Zell-Rezeptor-Mechanismen involvierte Gene wie *BLNK* (B-Zell Linker Protein), *SYK* (Spleen Tyrosin Kinase) und *FOS* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) in höherem Maße zu exprimieren scheinen, als V_H -unmutierte CLL-Fälle, die nicht das V_H1-69 -Gen umgelagert haben. (64) Abschließend ist zu sagen, dass eine noch nähere Beleuchtung von Mechanismen der Antigenstimulation und B-Zell-Rezeptorsignalwegen weiteren Aufschluss über Pathogenese und den heterogenen klinischen Verlauf der CLL geben könnte.

4.2. Überlebensanalyse der V_H3-21-Patienten/Korrelation mit weiteren prognostischen Markern (ZAP-70 und CD38)

Eine weitere entscheidende Beobachtung war, in Übereinstimmung mit Vorarbeiten unserer kooperierenden schwedischen Arbeitsgruppe (122, 123) das ausgesprochen kurze Gesamtüberleben (medianes Überleben 88 Monate) der V_H3-21-Patienten unabhängig vom V_H-Mutationsstatus. Der V_H-Gen Mutationsstatus ist bei der CLL als bedeutender prognostischer Marker etabliert, mit einem deutlich längeren Gesamtüberleben von Patienten mit somatisch hypermutierten V_H-Genen. (23, 52, 73) Im aktuell untersuchten V_H3-21-Patientenkollektiv hatten 63 % einen mutierten V_H-Status, zeigten aber dennoch eine ähnlich schlechte Prognose, wie die unmutierten V_H3-21-Patienten und im historischen Vergleich wie Patienten mit anderen unmutierten V_H-Genen. Folglich ist in der Patientensubgruppe der V_H3-21-Patienten der V_H-Mutationsstatus nicht für eine prognostische Aussage anwendbar. Darüberhinaus wurden innerhalb des V_H3-21-Kollektivs weitere Patientensubgruppen im Hinblick auf ihr Gesamtüberleben verglichen. So wurden Patienten mit homologen HCDR3-Regionen und nicht homologen HCDR3-Regionen, sowie Patienten mit Umlagerung des V_λ2-14-Gens und jenen die ein anderes V_L-Gen umgelagert hatten gegenübergestellt ohne den Nachweis signifikanter Überlebensunterschiede zu erbringen. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu einer Untersuchung an V_H3-21-Fällen im Mittelmeerraum, die einen aggressiveren Erkrankungsverlauf vorwiegend bei Patienten mit homologen HCDR3s beobachtet hatten. (45) Die vergleichsweise geringe Anzahl an untersuchten Patienten mit V_H3-21-Genumlagerung in diesem Kollektiv von CLL-Fällen aus dem Mittelmeerraum (16 Fälle) könnte eine mögliche Erklärung dieser abweichenden Beobachtung sein. Im Hinblick auf die Rolle von antigenstimulierenden Faktoren in der Pathogenese der CLL wäre allerdings ein Zusammenhang zwischen homologen HCDR3s und LCDR3s und einem ungünstigeren, klinischen Verlauf durchaus denkbar. So könnten bestimmte Antigene, die besonders gut zu bestimmten homologen B-Zell-Rezeptoren passen für eine kontinuierliche Rezeptorstimulation und eine in der Folge erhöhte Proliferationsaktivität mit schnellerem Progress der Erkrankung verantwortlich sein.

Die Analysen weiterer, bei der CLL bedeutender prognostischer Marker (CD38-Expression bei 43 Patienten, ZAP-70-Expression bei 10 Patienten) zeigten, daß ein beträchtlicher Anteil sowohl V_H-mutierter als auch V_H-unmutierter V_H3-21-Patienten eine hohe CD38-

Expression ($> 20\%$ d. Zellen $CD38^+$) bzw. ZAP-70-Expression ($>20\%$ d. Zellen $ZAP-70^+$) aufweist.

Bei den 10 bezüglich ihrer ZAP-70-Expression untersuchten Fällen zeigte sich ein Überwiegen an Patienten mit erhöhter ZAP-70-Expression innerhalb des V_H3-21 -Kollektivs. (7 Patienten: ZAP-70-Expression $\geq 20\%$, 3 Patienten: ZAP-70-Expression $< 20\%$) Die Tatsache, dass die Signalübertragung, die durch Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor vermittelt wird durch experimentelle Steigerung der ZAP-70-Expression erleichtert werden kann (69) weist auf eine Bedeutung von ZAP-70 bei der antigenabhängigen B-Zell-Rezeptorstimulation hin. Dies wird durch die Ergebnisse aus in vitro-Analysen gestützt, die bei V_H -unmutierten CLL-Zellen die Beteiligung von ZAP-70 bei BCR-initiierten Signalkaskaden zeigen. (12) Die Untersuchung der ZAP-70-Expression bei einer größeren Anzahl an V_H3-21 -Patienten sollte dabei weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von Mechanismen der Antigenselektion und Antigenstimulation bringen. Dabei wäre in Anbetracht einer zu vermutenden erhöhten Antigenstimulation des BCR innerhalb dieser Patientengruppe auch eine erhöhte ZAP-70-Expression bei einem Großteil der Patienten zu erwarten. So konnten unlängst durchgeführte Genexpressionsanalysen an V_H3-21 -Patienten eine gegenüber V_H -unmutierten CLL-Patienten ohne V_H3-21 -Umlagerung deutlich erhöhte ZAP-70-Expression zeigen. (64) Einige Gene, die ebenfalls in B-Zell-Rezeptor-Signalwege eingebunden sind, wie z.B. *PI3K* (Phosphoinositid 3-Kinase) und *CCND2* (Cyclin D2) zeigten sich unter anderem herunterreguliert, was auf alternative Pathways bei der BCR-Stimulation schließen lässt. Erstaunlicherweise waren auch Kandidatengene wie *BAX* (Bcl-2-associated X protein) und *P27* (Cyclin dependent Kinase Inhibitor 1b) herunterreguliert, was für eine Apoptosehemmung und eine verringerte Hemmung der Zellteilung als zusätzliche pathogenetische Faktoren bei den V_H3-21 -Patienten spricht. (64) Weitere Genexpressionsanalysen an V_H3-21 -Patienten, die mit V_H -mutierten und V_H -unmutierten CLL-Patienten ohne Umlagerung des V_H3-21 -Gens verglichen wurden, konnten ein charakteristisches, sich von den V_H -mutierten und V_H -unmutierten CLL-Fällen unterscheidendes Genexpressionsprofil zeigen. (37) Dabei fanden sich vor allem Unterschiede für Gene mit Zellzyklus-Aktivität sowie für Gene mit Bedeutung bei Transkriptionsvorgängen. Dies ist möglicherweise als Ausdruck eines aggressiveren Phänotyps der V_H3-21 -Patienten zu werten. Hinweise für eine gesteigerte Aktivität von B-Zell-Rezeptor-Signalwegen ließen sich hier jedoch nicht finden. Bei fehlender T-Zell-Depletion im Versuchsansatz war hier über ZAP-70 als bedeutender

Marker der B-Zell-Rezeptoraktivität jedoch keine Aussage möglich. Mehrere bedeutende Untersuchungen konnten eine deutliche Korrelation von hoher ZAP-70-Expression und unmutiertem V_H-Mutationsstatus nachweisen und diskutieren die ZAP-70-Expression als unabhängigen prognostischen Faktor bei der CLL. (21, 75, 99, 106, 127) Eine weitere interessante Beobachtung der aktuell durchgeführten ZAP-70-Expressionsanalysen bei einer allerdings vergleichsweise geringen Fallzahl (n=10) war, in Übereinstimmung mit ähnlichen Untersuchungen (75), folgender Zusammenhang: Im Hochrisikokollektiv der V_H-3-21- Patienten war eine höhere Diskordanz (also V_H-unmutiert und ZAP-70⁻, oder V_H-mutiert und ZAP-70⁺) zwischen ZAP-70-Expression und V_H-Mutationsstatus von 60% [6 von 10 Fällen, im Vergleich 9/16 entsprechend 56% (75)] als bisher bei CLL-Patienten beschrieben zu beobachten. In der Literatur ist eine Diskordanzrate zwischen 5 und 23% beschrieben: Orchard Lancet 2004 (99): 5% Diskordanz, Crespo NEJM 2003 (21): 8% Diskordanz, Rassenti NEJM 2004 (106): 23% Diskordanz. Auch zeigt sich bei den bezüglich ZAP-70-Expression und V_H-Mutationsstatus diskordanten V_H3-21-Fällen ein deutliches Überwiegen der Konstellation ZAP-70⁺ und V_H-mutiert (5/10 Patienten) mit lediglich 1 diskordanten Fall, der die Konstellation V_H-unmutiert und ZAP-70⁻ aufwies. Die weitere Beleuchtung dieses Zusammenhangs an größeren Fallzahlen und die Einordnung ihrer Bedeutung für Pathogenese und B-Zell-Rezeptorvorgänge wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte bei einer beträchtlichen Anzahl von Patienten (20/43 Fälle: 46% der analysierten Patienten) eine erhöhte CD38-Expression, die definiert war mit einer Expression bei > 20% der CLL-Zellen, nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich in verschiedenen CLL-Kollektiven unterschiedliche Häufigkeiten an CD38⁺-Patienten, wobei die Häufigkeit zum einen möglicherweise durch Unterschiede in der technischen Durchführung der Durchflußzytometrie und zum anderen durch unterschiedliche Wahl des Cut-Off-Prozentsatzes der CD38-Expression zu erklären sind. Bei Wahl eines 20%-Cut-Offs schwanken die Häufigkeiten zwischen 26% (84) und 44%. (58) Ein eindeutiges Überwiegen, der als prognostisch ungünstig zu wertenden erhöhten CD38-Expression in dem Hochrisikokollektiv der V_H3-21-Patienten ließ sich an den hier untersuchten 43 jedoch nicht nachweisen. In den Gruppen mit positiver bzw. negativer CD38-Expression waren die V_H-mutierten und V_H-unmutierten Fälle mit vergleichbaren Häufigkeiten und Prozentzahlen verteilt. (CD38⁺: 12 V_H-mutiert/8 V_H-unmutiert entsprechend 60% V_H-mutiert/40% V_H-unmutiert. CD38⁻: 14 V_H-mutiert/9 V_H-unmutiert entsprechend 61% V_H-

mutiert/39% V_H -unmutiert). Dabei zeigte sich bei den Patienten mit höherer CD38-Expression bemerkenswerterweise im Gegensatz zu Voruntersuchungen an großen CLL-Kollektiven bei denen innerhalb der CD38⁺-Gruppe die V_H -unmutierten Fälle deutlich überwogen [Damle Blood 1999 (23): CD38⁺: 100% V_H -unmutiert, bei einem Cut-Off-Wert von 30%] hier sogar ein leichtes Überwiegen der V_H -mutierten Fälle. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf die besondere Zusammensetzung des untersuchten V_H3 -21-Kollektivs, mit seiner eigenständigen prognostischen Bedeutung zurückzuführen. Ob innerhalb der V_H3 -21-Patienten eine unabhängige prognostische Bedeutung für die CD38-Expression besteht war nicht Gegenstand der aktuellen Analysen, sollte aber mit größeren Patientenzahlen in der Zukunft näher beleuchtet werden.

Bei den 55 im Hinblick auf chromosomale Aberrationen untersuchten Patienten ergab sich interessanterweise eine gegenüber Voruntersuchungen [Kröber et al. Blood 2002 (73): 17% 11q-Deletionen, Döhner et al. NEJM 2000 (33): 18% 11q-Deletionen] leicht erhöhte Anzahl von 11q-Deletionen von 27%. Dies läßt sich in ähnlicher Weise auch bei der getrennten Beobachtung der V_H -mutierten und V_H -unmutierten Patienten feststellen (24% in der V_H -mutierten Gruppe bzw. 33% in der V_H -unmutierten Gruppe) was in Kontrast zu Voruntersuchungen steht, die ein ausgeprägtes Überwiegen der Hochrisikoaberrationen Deletion-11q und Deletion-17p in der V_H -unmutierten Subgruppe zeigen konnten. (Kröber et al. Blood 2002 (73): 35% Deletion-11q/17p bei V_H -unmutierten Patienten gegenüber 7% bei V_H -mutierten Patienten. Deletion-11q: 27% in der V_H -unmutierten Gruppe, 4% in der V_H -mutierten Gruppe) Innerhalb des V_H3 -21-Kollektivs war außerdem der Prozentsatz an Patienten mit chromosomaler Aberration im Allgemeinen leicht erhöht. (87%) Eine mögliche Erklärung dieser Häufung an chromosomalen Hochrisikoaberrationen in dem untersuchten Kollektiv ist eine durch Antigenstimulation des V_H3 -21/ V_λ 2-14-B-Zell-Rezeptors gesteigerte Proliferations- und Zellteilungsrate, die folglich die Wahrscheinlichkeit für den Hinzugewinn genetischer Läsionen erhöht. Ob dabei ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von chromosomalen Hochrisikoaberrationen (Deletion-11q, Deletion-17p) und dem Vorliegen von homologen V_H3 -21-umlagernden B-Zell-Rezeptoren besteht wurde aktuell nicht untersucht, sollte aber in Anbetracht möglicher pathogenetischer Zusammenhänge weiter aufgeschlüsselt werden.

Darüberhinaus wäre auch die nähere Beleuchtung der Proliferationsgeschichte der V_H3 -21 CLL-Klone von Interesse, wie dies beispielsweise durch Bestimmung der Telomerlänge an V_H -unmutierten und V_H -mutierten CLL-Patienten bereits geschehen ist. Dort ergab sich

für Patienten mit unmutiertem V_H -Gen eine signifikant kürzere Telomerlänge, die auf eine höhere Proliferationsaktivität innerhalb dieser Subgruppe hindeutet. (25, 48) So sollte man für die V_H -3-21-Patienten eine ebenfalls geringe Telomerlänge als Ausdruck einer hohen Zellteilungsrate erwarten. Ob dabei möglicherweise noch kürzere Telomere als bei V_H -unmutierten CLL-Patienten ohne Umlagerung des V_H 3-21-Gens zu finden sind, müssten entsprechende Experimente zeigen.

4.3. Geographische Verteilung von V_H 3-21-Patienten

In Studien aus Schweden, Nordirland und Großbritannien fanden sich vergleichsweise häufiger (ca. 9-10%) V_H 3-21-Patienten (85, 90, 122, 123) als bei CLL-Studien aus anderen europäischen Ländern und den Vereinigten Staaten von Amerika. (zwischen 0 und 3%) (39, 45, 52, 87) Dabei stellt sich die Frage nach der Ursache des unterschiedlich häufigen Auftretens des V_H 3-21-Gens innerhalb dieser verschiedenen Patientenkollektive. Unserer Meinung nach spielt hierbei die Auswahl der Patientengruppen eine ganz wesentliche Rolle für die Ergebnisse der V_H -Gen-Untersuchungen. Die in Schweden und Deutschland (speziell in Ulm) untersuchten Proben wurden jeweils in Schwerpunktzentren gesammelt, was zu einem Patientenkollektiv führte, das sich insgesamt aus Patienten mit schlechterer Prognose bzw. aggressiverem oder komplikationsreicherem Erkrankungsverlauf zusammensetzt als bei einem Kollektiv aus Patienten eines regionalen Krankenhauses. In Übereinstimmung mit dieser Annahme, war das mediane Überleben bei früheren Untersuchungen an Ulmer Patienten, signifikant kürzer als bei anderen Untersuchungen bei denen eine größere Anzahl an Patienten im Krankheitsstadium Binet A einbezogen wurden. (23, 52, 73, 122, 123) Darüberhinaus verfügten die meisten zum V_H -Mutationsstatus bzw. zur V_H -Genumlagerung veröffentlichten Arbeiten nicht über bevölkerungsrepräsentative Proben und untersuchten zumindest zu einem gewissen Anteil vorselektiertes Material. Andererseits spricht die Tatsache, dass die Häufigkeit anderer V_H -Rearrangements wie beispielsweise des V_H 1-69-Gen-Rearrangements in verschiedenen Teilen der Erde und unterschiedlichen Untersuchungen weitestgehend gleich ist [(89), Tobin Blood 2004 (124): 14% bzw. 54 Fälle, Widhopf Blood 2004 (126): 13,8% bzw. 164/1220 Fälle, Johnson The Journal of Immunology 1997 (60): 22%, Fais The Journal of Clinical Investigation 1998 (39), Kipps Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1989 (65): 14%], dafür dass tatsächliche regionale Unterschiede in der V_H 3-

21-Häufigkeit bestehen könnten. Auch im Hinblick auf die angesprochenen Hypothesen zur Rolle der Antigenselektion wäre eine unterschiedliche geographische Verteilung bestimmter V_H -Gene bemerkenswert, da dies auch durch die unterschiedliche Verteilung bestimmter Antigene in unterschiedlichen geographischen Umgebungen mitbedingt sein könnte. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv variierte die Häufigkeit des V_{H3-21} -Gens merklich. In der Schwedischen Kohorte fanden sich dabei die meisten V_{H3-21} -Fälle. In absteigender Reihenfolge folgten Finnland, Deutschland/Italien und USA/Australien. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine unterschiedliche Exposition mit potentiellen Antigenen in verschiedenen Teilen der Welt. Auch wenn regionale Unterschiede in der V_{H3-21} -Häufigkeit möglicherweise bestehen zeigen unsere aktuellen Untersuchungen dass sich die $V_{H3-21}/V_{\lambda 2-14}$ -B-Zell-Rezeptoren bei CLL-Patienten aus allen Teilen der Welt wiederfinden lassen. In der Zukunft könnten bevölkerungsgestützte Untersuchungen des V_H -Gen Status an großen CLL-Patientenserien weiteren Aufschluß über die tatsächliche Häufigkeitsverteilung verschiedener V_H -Gene bringen.

4.4. Immunglobulin-Leichtkettenstruktur

Da die V_{H3-21} -CLL-Subgruppe durch eine deutlich bevorzugte Expression von λ -Leichtketten gekennzeichnet ist, führt uns dies zu der Frage inwieweit die V_{H3-21} -Fälle den klassischen Weg der Leichtkettenumlagerung (Ig_{κ} -Allel1 > Ig_{κ} -Allel2 > Ig_{λ}) durchschritten haben. In den meisten der 42 untersuchten V_{H3-21} - λ -exprimierenden Patienten, waren die amplifizierten V_{κ} -Gen-Rearrangements aufgrund eines umgelagerten KDEs und/oder eines V_{κ} -Rearrangements das ausserhalb des Leserahmens (out of frame) umgelagert wurde nicht funktionell. Dies deutet darauf hin, dass die Leichtkettenumlagerung bei V_{H3-21} -Fällen dem bekannten hierarchischen Rekombinationsmodell folgt und bereits mehrere Umlagerungsversuche vor der Bildung einer funktionellen λ -Leichtkette durchlaufen hat. Der Grund für diese mehrfachen Umlagerungsereignisse, die in der Mehrzahl der V_{H3-21} -Fälle zu beobachten sind ist unklar, aber es kann vermutet werden dass Mechanismen der negativen Selektion am B-Zell-Rezeptor der V_{H3-21}/V_{κ} -Rearrangements einen Einfluss auf die Art der Umlagerung gehabt haben könnten.

4.5. Schlussfolgerung

Schlussfolgernd lässt sich bemerken, dass die homologen $V_{H3-21}/V_{\lambda 2-14}$ -Rearrangements bei CLL-Patienten aus den verschiedensten Zentren der ganzen Welt detektiert werden konnten. Die starke Übereinstimmung der HCDR3/LCDR3-Regionen bei einer relativ großen Anzahl an CLL-Patienten, die durch zufällige Vorkommnisse nicht zu erklären ist, deutet auf die Bedeutung von Antigenselektionsmechanismen in der Krankheitsentwicklung der V_{H3-21} -CLL-Patienten hin. Die Umlagerung des V_{H3-21} -Gens war ausserdem assoziiert mit einer erhöhten Expression von CD38 und ZAP-70 und einem aggressiveren Erkrankungsverlauf, unabhängig vom Mutationsstatus oder dem Bestehen einer homologen CDR3-Region. Die unabhängige prognostische Bedeutung der Benutzung des V_{H3-21} -Gens sollte in Zukunft bei der prognostischen Abschätzung von CLL-Patienten berücksichtigt und in zukünftige Modelle zur Risikostratifizierung einbezogen werden.

5. Zusammenfassung

In Vorarbeiten an schwedischen CLL-Patienten (Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie) mit Umlagerung des V_{H3-21} -Gens (Gen 3-21 für die Variable Region der Immunglobulin-Schwerkette) konnten spezifische Immunglobulin-Gen-Merkmale und eine vom IgV_H -Gen-Mutationsstatus (Mutationsstatus des Gens für den variablen Anteil der Immunglobulin-Schwerkette) unabhängig schlechte Prognose gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nun bei einem Kollektiv von 90 V_{H3-21} -Patienten (Patienten mit Umlagerung der Variable Region 3-21 der Immunglobulin-Schwerkette) aus verschiedenen Teilen der Welt die Merkmale des V_H - sowie V_L -Gen-Rearrangements (V_L : Variable Region der Immunglobulin-Leichtkette) näher untersucht und die Ergebnisse mit anderen prognostischen Markern und dem Gesamtüberleben in Beziehung gesetzt. Dabei fand sich bei 63% ein mutiertes ($< 98\%$ Keimbahnhomologie zum nächst verwandten Keimbahnen) und bei 37% ein unmutiertes ($\geq 98\%$ Keimbahnhomologie zum nächst verwandten Keimbahnen) V_{H3-21} -Gen. Bei 56% der Patienten ergab sich eine kurze HCDR3-Region (Heavy chain Complementary Determining Region 3 der Immunglobulin-Schwerkette) mit einer hohen Übereinstimmung in der Basenabfolge. Viele Patienten wiesen dabei das Aminosäuremotiv Asparaginsäure-Alanin-Asparagin-Glycin-Methionin-Asparaginsäure-Valin (DANGMDV) auf. Darüberhinaus zeigte sich eine stark bevorzugte Leichtkettenumlagerung des $V_{\lambda 2-14}$ -Gens (Gen 2-14 für die Variable Region der Lambda-Leichtkette des Immunglobulins) in Verbindung mit einer bestimmten LCDR3-Region (Light chain Complementary Determining Region 3 der Immunglobulin-Leichtkette) mit der Aminosäureabfolge: Glutamin-Valin-Tryptophan-Asparaginsäure-Serin-(Serin/Glycin)-Serin-Asparaginsäure-Histidin-Prolin-Tryptophan-Valin. (QVWDS(S/G)SDHPWV) Erstaunlicherweise ließ sich diese Kombination aus exakt definierter HCDR3- und LCDR3-Region bei einer beträchtlichen Patientenzahl aus allen Herkunftsländern nachweisen. Obwohl die V_{H3-21} -CLL-Fälle auffallend häufig die Expression von Lambda-Leichtketten zeigten, deutet die Analyse des KDE (Kappa-deleting-Element/Kappa-Leichtketten deletierendes Element) auf eine intakte, physiologische Reihenfolge in der Leichtkettenumlagerung hin. Das mediane Gesamtüberleben war mit 88 Monaten in der V_{H3-21} -Gruppe deutlich reduziert. Ein signifikanter Überlebensunterschied innerhalb des Kollektivs in Abhängigkeit vom V_H -

Mutationsstatus oder dem Vorliegen einer hohen Übereinstimmung in der HCDR3-Region ergab sich nicht. Ebenso zeigten Patienten mit kurzer bzw. langer HCDR3-Region oder Patienten mit Umlagerung des $V_{\lambda}2-14$ -Gens bzw. Umlagerung anderer V_L -Gene keine Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben. Hohe Expressionsraten an ZAP-70 (Zeta-associated protein 70) und CD38 (Cluster of Differentiation 38), ebenso wie ein etwas gehäuftes Auftreten an Deletion-11q (Deletionen am langen Arm von Chromosom Nummer 11) fanden sich sowohl bei den mutierten als auch bei den unmutierten V_{H3-21} -Fällen. Zusammenfassend ist eine Vielzahl der V_{H3-21} -CLL-Fälle unabhängig von deren geographischer Herkunft oder deren Mutationsstatus durch eine überzufällig häufig auftretende Struktur des B-Zell-Rezeptors gekennzeichnet. Die Bedeutung dieser Befunde im Hinblick auf die Pathogenese und Biologie der CLL (Chronische Lymphatische Leukämie) sowie der mögliche Einfluss von Antigenstimulationsmechanismen auf Entwicklung und Fortschreiten der Erkrankung sowie die Identifikation potentieller Auto- oder Fremdartigene wird in der Zukunft zu untersuchen sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Benschop RJ, Cambier JC: B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol* 11: 143-151. (1999)
2. Berek C, Ziegner M: The maturation of the immune response. *Immunol Today* 14: 400-404. (1993)
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48: 198-206. (1981)
4. Blasco MA: Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer* 2: 627-633. (2002)
5. Borche L, Lim A, Binet JL, Dighiero G: Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood* 76: 562-569. (1990)
6. Broccoli D, Young JW, de Lange T: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9082-9086. (1995)
7. Broker BM, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J, Mackenzie L, Quartey-Papafio R, Blaschek M, Collins P: Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. *J Autoimmun* 1: 469-481. (1988)
8. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R: Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol Immunol* 29: 193-203. (1992)

9. Casola S, Otipoby KL, Alizhanov M, Humme S, Uyttersprot N, Kutok JL, Carroll MC, Rajewsky K: B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5: 317-327. (2004)
10. Catovsky D, Harris NL, Montserrat E, Müller-Hermelink HK: Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic leukaemia. In: Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, Bd 3, IARC Press: Lyon France, 127-130. (2001)
11. Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, Zucca E: MALT-Lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 241-258. (2001)
12. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ: Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 4609-4614. (2002)
13. Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ: ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 105: 2036-2041. (2005)
14. Chiorazzi N, Ferrarini M: B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the b cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 21: 841-894. (2003)
15. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352: 804-815. (2005)
16. Claverie JM, Langman R: Models for the rearrangements of immunoglobulin genes: a computer view. *Trends Biochem Sci* 9: 293-296. (1984)

17. Coleclough C, Perry RP, Karjalainen K, Weigert M: Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* 290: 372-378. (1981)
18. Cook GP, Tomlinson IM: The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 16: 237-242. (1995)
19. Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhammer EL, Buck D, Winter G: Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: A systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 270: 587-597. (1997)
20. Coupland SE, Hummel M, Stein H: Lymphatic system and differentiation of B and T lymphocytes. *Pathologe* 21: 106-112. (2000)
21. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E: ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348: 1764-1775. (2003)
22. Dahlenborg K, Pound JD, Gordon J, Borrebaeck CA, Carlsson R: Signals sustaining human immunoglobulin V gene hypermutation in isolated germinal centre B cells. *Immunology* 101: 210-217. (2000)
23. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1840-1847. (1999)

24. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J, Sison CP, Allen LA, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N: B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 99: 4087-4093. (2002)
25. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK, Chiorazzi N: Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL-subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 103: 375-382. (2004)
26. De Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE: Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10: 518-527. (1990)
27. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S: Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 2633-2639. (2001)
28. De Re V, De Vita S, Carbone A, Ferraccioli G, Gloghini A, Marzotto A, Pivetta B, Dolcetti R, Boiocchi M: The relevance of VDJ PCR protocols in detecting B-cell clonal expansion in lymphomas and other lymphoproliferative disorders. *Tumori* 81: 405-409. (1995)
29. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P: Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 81: 181-185. (1989)

30. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S: 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)
31. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P: 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 89: 2516-2522. (1997)
32. Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med* 77: 266-281. (1999)
33. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober 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)
34. 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)
35. Ely SA, Chadburn A, Dayton CM, Cesarman E, Knowles DM: Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 89: 445-452. (2000)
36. Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Guillem J, Scher HI, Reuter V, Moore MA: Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon and sarcoma. *Clin Cancer Res* 3: 1849-1857. (1997)

37. Fält S, Merup M, Tobin G, Thunberg U, Gahrton G, Rosenquist R, Wennborg A: Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106: 681-689. (2005)
38. Faguet GB: Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol* 12: 1974-1990. (1994)
39. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW, Jr., Ferrarini M, Chiorazzi N: Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 102: 1515-1525. (1998)
40. Fisher RA: On the interpretation of chi-square from contingency tables, and the calculation of p. *J R Stat Soc* 85: 87-94. (1922)
41. Funaro A, Morra M, Calosso L, Zini MG, Ausiello CM, Malavasi F: Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens* 49: 7-15. (1997)
42. Gaidano G, Newcomb EW, Gong JZ, Tassi V, Neri A, Cortelezzi A, Calori R, Baldini L, Dalla-Favera R: Analysis of alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Pathol* 144: 1312-1319. (1994)
43. Gale RP, Foon KA: Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 24: 209-229. (1987)
44. Geisler CH, Philip P, Christensen BE, Hou-Jensen K, Pedersen NT, Jensen OM, Thorling K, Andersen E, Birgens HS, Drivsholm A, Ellegaard J, Larsen JK, Plesner T, Brown P, Andersen PK, Hansen MM: In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 21: 1011-1023. (1997)

45. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 105: 1678-1685. (2005)
46. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N: Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 113: 1008-1016. (2004)
47. Goossens T, Bräuninger A, Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Receptor revision plays no major role in shaping the receptor repertoire of human memory B cells after the onset of somatic hypermutation. *Eur J Immunol.* 31:3638-3648. (2001)
48. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Aleskog A, Thunberg U, Laurell A, Sundström S, Rosenquist R, Roos G: Telomer length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to V_H gene mutation status. *Blood* 105: 4807-4812. (2005)
49. Graninger WB, Goldman PL, Morton CC, O'Brien SJ, Korsmeyer SJ: The kappa-deleting element. Germline and rearranged, duplicated and dispersed forms. *J Exp Med* 167: 488-501. (1988)
50. Grawunder U, West RB, Lieber MR: Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 10: 172-180. (1998)
51. 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 thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93: 1732-1737. (1999)
52. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 1848-1854. (1999)

53. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK: Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 95: 2455-2457. (2000)
54. Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460. (1990)
55. Harley CB: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-282. (1991)
56. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, Chiorazzi N, Meffre E: Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemia derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 115: 1636-1643. (2005)
57. Hieter PA, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P: Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature* 290: 368-372. (1981)
58. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M: CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98: 181-186. (2001)
59. Jacobs H, Bross L: Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 13: 208-218. (2001)
60. Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ: Ig vh1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol* 158: 235-246. (1997)
61. Juliusson G, Merup M: Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 25: 19-26. (1998)

62. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C: National Institutes of Health (Hrsg.): Sequences of proteins of immunological interest, 5.Aufl., Diane Books Publishing Company: Darby Philadelphia, NIH publication No 91-3242. (1991)
63. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481. (1958)
64. Kienle D, Benner A, Kröber A, Winkler D, Mertens D, Bühler A, Seiler T, Jäger U, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood* 107: 2090-2093. (2006)
65. Kipps TJ, Tomhave E, Pratt LF, Duffy S, Chen PP, Carson DA: Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5913-591. (1989)
66. Klein F, Feldhahn N, Mooster JL, Sprangers M, Hofmann WK, Wernet P, Wartenberg M, Muschen M: Tracing the pre-B to immature B cell transition in human leukemia cells reveals a coordinated sequence of primary and secondary IGK gene rearrangement, IGK deletion, and IGL gene rearrangement. *J Immunol* 174: 367-375. (2005)
67. Klein U, Yuhai T, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R: Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogenous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 194: 1625-1638. (2001)
68. Klobeck HG, Zachau HG. The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. *Nucleic Acids Res* 14: 4591-4603.(1986)
69. Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC: Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* 2: 485-492. (1995)

70. Korn EL: Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med* 5: 255-260. (1986)
71. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7096-7100. (1981)
72. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Sharrow SO, Goldman CK, Leder P, Waldmann TA: Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med* 156: 975-985. (1982)
73. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H: V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1410-1416. (2002)
74. Kröber A, Grabowski P, Bühler A, Döhner H, Rosenquist R, Roos G, Stilgenbauer S: Short telomeres are associated with genetic instability and the occurrence of high risk genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106 (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract 1178. (2005)
75. Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, Winkler D, Bangerter M, RF Schlenk, Benner A, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 24: 969-975. (2006)
76. Kruskal WH, Wallis WA: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47: 583-621. (1952)
77. Küppers R, Zhao M, Rajewsky K, Hansmann ML: Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 143: 230-239. (1993)

78. Küppers R, Willenbrock K, Rajewsky K, Hansmann ML: Detection of clonal lambda light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 147: 806-814. (1995)
79. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K: Micromanipulation and PCR analysis of single cells from tissue sections. In: Herzenberg LA, Weir D, Blackwell D (Hrsg): *Handbook of Experimental Immunology*, 5. Aufl., Blackwell Science: Oxford, 206.1-206.4 (1996)
80. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G: Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101: 1087-1093. (2003)
81. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225: 951-960. (1992)
82. Li AH, Rosenquist R, Forestier E, Holmberg D, Lindh J, Lovfenberg F, Roos G: Clonal rearrangements in childhood and adult precursor B acute lymphoblastic leukemia: a comparative polymerase chain reaction study using multiple sets of primers. *Eur J Haematol* 63: 211-218. (1999)
83. Li AH, Rosenquist R, Forestier E, Lindh J, Roos G: Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Leuk Res* 25: 1033-1045. (2001)
84. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR: Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression and IgVH mutation in CLL. *Blood* 100: 1404-1409. (2002)
85. Lin K, Manocha S, Harris RJ, Matrai Z, Sherrington PD, Pettitt AR: High frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the VH3-21 gene segment. *Blood* 102: 1145-1146. (2003)

86. Liu CP, Tucker PW, Mushinski JF, Blattner FR: Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and D. *Science* 209: 1348-1353. (1980).
87. Maloum K, Davi F, Merle-Beral H, Pritsch O, Magnac C, Vuillier F, Dighiero G, Troussard X, Mauro FF, Benichou F: Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 96: 377-379. (2000)
88. Matrai Z, Lin K, Dennis M, Sherrington P, Zuzel M, Pettitt AR, Cawley JC: CD38 expression and Ig VH gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97: 1902-1903. (2001)
89. Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, Matsumura R, Haino M, Fukita Y, Taka-ishi S, Imai T, Riley JH, Anand R: Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8- megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nat Genet* 3: 88-94. (1993)
90. Matthews C, Catherwood M, Morris TC, Alexander HD: Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-standardized primers and protocols. *Leuk Lymphoma* 45: 1899-1904. (2004)
91. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M: Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 200: 519-525. (2004)
92. Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N: The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 103: 3490-3495. (2004)
93. Monroe JG: Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Curr Opin Immunol* 16: 288-295. (2004)

94. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C: Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 62: 567-575. (1986)
95. Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529. (1989)
96. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR: A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG), present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622-6626. (1988)
97. Nemazee D, Kouskoff V, Hertz M, Lang J, Melamed D, Pape K, Retter M: B-cell-receptor-dependent positive and negative selection in immature B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 245: 57-71. (2000)
98. Nilsson P, Mehle C, Remes K, Roos G: Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 9: 3043-3048. (1994)
99. Orchard JA, Ibbotson RA, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG: ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 363: 105-111. (2004)
100. Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK: Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 89: 4153-4160. (1997)
101. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ: Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 100: 1177-1184. (2002)

102. Park K, Kim J, Kim HS, Shin HS: Isolated human germinal center centroblasts have an intact mismatch repair system. *J Immunol* 161: 6128-6132. (1998)
103. Potter KN, Orchard J, Critchley E, Mockridge CI, Jose A, Stevenson FK: Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood* 101: 3082-3084. (2003)
104. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M: B-lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 177: 1165-1173. (1993)
105. Rai KR, Han T: Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 4: 447-456. (1990)
106. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ: ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in CLL. *N Eng J Med* 351: 893-901. (2004)
107. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P: Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27: 583-591. (1981)
108. Rolink AG, Schaniel C, Andersson J, Melchers F: Selection events operating at various stages in B cell development. *Curr Opin Immunol* 13: 202-207. (2001)
109. Rosenquist R, Lindström A, Holmberg D, Lindh J, Roos G: V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur J Haematol* 62: 123-128. (1999)

110. 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)
111. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F: Bone marrow histologic pattern-the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 64: 642-648. (1984)
112. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H, Lichter P: Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94: 748-753. (1999)
113. Schroeder HW Jr., Dighiero G: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15: 288-294. (1994)
114. Schwartz RS: Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. *N Engl J Med* 333: 42-44. (1995)
115. Sekiguchi J, Frank K: V(D)J recombination. *Curr Biol* 9: R835. (1999)
116. Sembries S, Pahl H, Stilgenbauer S, Döhner H, Schriever F: Reduced expression of adhesion molecules and cell signaling receptors by chronic lymphocytic leukemia cells with 11q deletion. *Blood* 93: 624-631. (1999)
117. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ: A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* 316: 260-262. (1985)

118. Siminovitch KA, Moore MW, Durdik J, Selsing E: The human kappa deleting element and the mouse recombining segment share DNA sequence homology. *Nucleic Acids Res* 15: 2699-2705. (1987)
119. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR, Lichtman SM, Schulman P, Weiselberg LR, Chiorazzi N: Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 169: 255-268. (1989)
120. Thunberg U, Johnson A, Roos G, Thörn I, Tobin G, Sällström J, Sundström C, Rosenquist R: CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97: 1892-1894. (2001)
121. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D: Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177: 1009-1020. (1993)
122. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström C, Roos G, Rosenquist R: Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 2262-2264. (2002)
123. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Söderberg O, Karlsson K, Merup M, Juliusson G, Vilpo J, Enblad G, Sundström C, Roos G, Rosenquist R: Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 101: 4952-4957. (2003)
124. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K, Enblad G, Merup M, Vilpo J, Juliusson G, Sundström C, Söderberg O, Roos G, Rosenquist R: Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 104: 2879-2885. (2004)

125. Walter MA, Surti U, Hofker MH, Cox DW: The physical organization of the human immunoglobulin heavy chain gene complex. *Embo J* 9: 3303-3313. (1990)
126. Widhopf II GF, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia B cells of over one percent of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 104: 2499-2504. (2004)
127. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM: ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101: 4944-4951. (2003)
128. Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V: Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187: 59-70. (1998)
129. Zupo S, Isnardi L, Megna M, Massara R, Malavasi F, Dono M, Cosulich E, Ferrarini M: CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood* 88: 1365-1374. (1996)
130. Zwiebel JA, Cheson BD: Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* 25: 42-59. (1998)

Danksagung

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Klinik realisieren zu können und Herrn Prof. Dr. med. S. Stilgenbauer für die Überlassung des Themas sowie die exzellente Betreuung und geduldige Einführung in die Thematik.

Dr. med. Alexander Kröber bin ich zu größtem Dank verpflichtet, in seiner Funktion als ständigem Ansprechpartner und für seine tatkräftige Unterstützung bei allen Schwierigkeiten und Unwegbarkeiten die im Rahmen dieser Dissertation zu meistern waren.

Ich danke der Arbeitsgruppe um Prof. Richard Rosenquist/Schweden, durch deren Kooperation die gemeinsam erhobenen Erkenntnisse und die hier vorgelegte Dissertation erst ermöglicht wurden.

Meine Kommilitonen Katrin Scherer und Till Seiler haben durch ihre tatkräftige Hilfe und Unterstützung großen Anteil an dem Geleisteten, und ihre moralische Unterstützung war von unschätzbarem Wert.

Annett Habermann, Sabrina Kleß sowie Alexandra Brodbeck haben durch ihre Unterstützung als medizin-technische Assistentinnen großen Anteil an den erhobenen Daten und natürlich gebührt auch ihnen mein herzlichster Dank.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern Anton und Helga Bühler, die ihren Sohn immer bedingslos unterstützt haben und bei meiner Lebensgefährtin Sabrina Däubler und unserem kleinen Sohn Niklas, die ich über alles liebe.