

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

**Charakterisierung der Diskordanz von ZAP-70 Expression und VH-
Mutationsstatus bei der chronischen lymphatischen Leukämie**

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

Johannes Bloehdorn
Stuttgart-Bad Cannstatt

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Karsten Stahnke

Tag der Promotion: 29.5.2008

Meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben,
meinem lieben Bruder
zum Dank.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL)	1
1.2 Entwicklung und Funktion der B-Zelle	2
1.3 Prognostische Parameter bei der B-CLL	4
1.3.1 VH-Mutationsstatus	4
1.3.2 Genomische Aberrationen	5
1.3.3 ZAP-70 Expression und Quantifizierungsmöglichkeit	6
1.4 Fragestellungen der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Patienten	10
2.2 Chemikalien und sonstige Materialien	10
2.3 Ermittlung der ZAP-70 Expression mittels Durchflusszytometrie	12
2.3.1 Immunphänotypisierung und Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS)	12
2.3.2 Aufbereitung der Patientenproben	13
2.3.3 Für die Immunphänotypisierung verwendete Antikörper	17
2.3.4 Färbung der Patientenproben	17
2.3.5 Messung der ZAP-70 Expression	18
2.3.6 Auswertung der gemessenen ZAP-70 Expression	19

2.4 Analyse genomischer Aberrationen und des VH-Status	20
2.5 Statistische Analyse	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Zusammenhang zwischen ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus und zusätzlichen genetischen Hochrisikomerkmalen wie 11q oder 17p Deletion und V3-21 Genbenutzung.	22
3.2 Prognostische Bedeutung von ZAP-70 Expression und VH-Status in univariaten Analysen.	27
3.3 Prognostische Bedeutung von ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus, V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Aberrationen in multivariaten Analysen.	31
4. Diskussion	34
4.1 Methodische Aspekte	34
4.2 Inhaltliche Aspekte	36
5. Zusammenfassung	41
6. Literaturverzeichnis	43
Danksagung	53
Lebenslauf	54

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Ak	Antikörper
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp
BSA	Bovines Serum Albumin
BCR	B-Zellrezeptor („B-cell receptor“)
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Region des Immunglobulins
Cut-off	Definierter Grenzwert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Energy Coupled Dye
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Foetales Kälberserum („fetal calf serum“)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
GAM	Goat-anti-mouse (gegen Mausimmunglobuline spezifische Antikörper der Ziege)
Ig	Immunglobulin
IgV _H	Variabler Anteil der Immunglobulin-Schwerkette („variable-heavy“)
IL-2	Interleukin 2
Ms Ig	Mausimmunglobulin
OS	Gesamtüberlebenszeit („overall-survival“)
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerithrin
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)

RPM	Umdrehungen pro Minute (“rounds per minute”)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SZT	Stammzelltransplantation
Tdt	Deoxynukleotidyltransferase
TFS	Überlebenszeit ohne Therapie (“treatment-free survival”)
TCR	T-Zellrezeptor („T-cell receptor“)
U-CLL	VH-unmutierte B-CLL Zellen
V3-21	Spezifisches Immunglobulin variable-heavy region Gen V3-21
VDJ	(variable-, diversity-, joining-) Segmente bzw. die codierenden Gene der Segmente eines Antikörpers
VH	variable-heavy gene, codierendes Gen für den variablen Teil der Immunglobulin-Schwerkette (IgVH)
ZAP-70	Zeta-associated protein of 70 kilo Dalton

1 Einleitung

1.1 Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist eine hämatologische Neoplasie, die durch klonale Expansion von kleinen, morphologisch reif erscheinenden B-Lymphozyten charakterisiert ist. Sie ist mit einem Gesamtanteil von etwa 30% die häufigste Leukämie von Erwachsenen in Westeuropa und Nordamerika (*Gale u. Foon 1987*). Ihr Vorkommen ist vor dem 4. Lebensjahrzehnt sehr gering. Ihre Inzidenz steigt vom 50. bis zum 80. Lebensjahr kontinuierlich, womit die B-CLL vornehmlich eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist (*Faguet 1994*).

Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 2:1 (*Gale u. Foon 1987*), über alle Altersgruppen hinweg beträgt die Inzidenz an Neuerkrankungen bezogen auf 100000 Einwohner 5,9 für Männer und 3 für Frauen. Die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr liegt in Deutschland bei Patienten unter 65 Jahren bei ungefähr 1100. Damit hat sie einen Anteil von 30% an allen Leukämien und ist gleichzeitig die häufigste Form des Non-Hodgkin-Lymphoms.

Der klinische Krankheitsverlauf zeigt von Patient zu Patient eine individuell verschiedene und hoch variable Dynamik. Während bei manchen Patienten die Krankheit innerhalb weniger Monate nach Diagnosestellung rasch fortschreiten und zum Tode führen kann, zeigen andere Patienten einen stabilen oder nur langsam progredienten Krankheitsverlauf über Jahrzehnte (*Rozman u. Montserrat 1995; Zwiebel u. Cheson 1998; Chiorazzi N et al. 2005*).

Die B-CLL wird heute meist im frühen, asymptomatischen oder symptomarmen Stadium diagnostiziert. Je nach Stadium kann auch eine klassische B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Leistungsminderung im Vordergrund stehen. Häufig finden sich Lymphknotenschwellungen und Splenomegalie im fortgeschrittenen Stadium. Der Verlauf der Erkrankung kann durch Infektionen, autoimmunhämolytische Anämien und den Übergang in ein aggressives Lymphom, dem sogenannten Richter-Syndrom, erschwert werden. In der klinischen Praxis hat sich die Stadieneinteilung nach Rai (*Rai et al. 1975; Rai u. Han 1990*) und Binet (*Binet et al. 1981*) durchgesetzt, die hauptsächlich auf der Erfassung

der betroffenen Lymphknotenstationen und dem Vorliegen von Anämie bzw. Thrombozytopenie beruhen.

Allerdings ist es anhand des klinischen Krankheitsstadiums nur begrenzt möglich, für einen Patienten individuelle Vorhersagen bezüglich Krankheitsprogression, Therapieansprechen oder Überlebenszeit zu treffen.

Die Überlebenszeit der Patienten konnte bislang durch den Einsatz einer konventionellen Therapie mit Chlorambucil in einer frühen Phase der Krankheit nicht verlängert werden (*Dighiero et al. 1998*). Daher ist die Behandlung außerhalb klinischer Studien palliativ ausgerichtet und wird erst bei symptomatischer Erkrankung eingeleitet (*Rai et al. 2000; Zwiebel u. Cheson 1998*).

In jüngerer Zeit sind neue hochwirksame und potentiell kurative therapeutische Strategien verfügbar geworden, z. B. Purinanaloga-Kombinationstherapien, monoklonale Antikörper wie Rituximab und Campath-1H sowie die autologe und allogene Stammzelltransplantation (SZT). Diese Therapieansätze unterscheiden sich erheblich in ihrer Intensität, den Kosten, Nebenwirkungen und Risiken.

Vor diesem Hintergrund erscheint es bedeutsam prognostische Faktoren zu identifizieren, die eine Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufs einzelner Patienten erlauben. Solche prognostischen Faktoren sind Voraussetzung für Entwicklung und Einsatz risikoadaptierter Therapiestrategien.

1.2 Entwicklung und Funktion der B-Zelle

Der Begriff B-Zelle wurde von *bursa fabricii* abgeleitet, einem lymphatischen Organ der Vögel, in dem B-Zellen gebildet werden und heranreifen. Der Mensch verfügt über kein entsprechendes Organ. Bei ihm entstehen die B-Lymphozyten in der 8. bis 9. Entwicklungswoche aus lymphoiden Stammzellen im blutbildenden Gewebe der fetalen Leber. Diese wird zunehmend durch das Knochenmark als B-Zell Bildungsort ersetzt.

Die lymphatischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich über die Stadien der Pro-B-Zelle und Prä-B-Zelle zur unreifen B-Zelle. Die Proliferation von lymphoiden Stammzellen, die terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT) exprimieren und ihre Differenzierung führt zum Rearrangement der Immunglobuline. Im Pro-B-Zell-Stadium findet

als erster Schritt der Immunglobulin (Ig)-Genumlagerung die Diversity (D)-Joining (J)-Verknüpfung und anschließend die Variable (V)-D-J-Verknüpfung des Schwerekettengens statt, die sich in Form einer Expression von Ig μ bei der Prä-B-Zelle im Zytoplasma nachweisen lässt (Coupland et al. 2000; Grawunder et al. 1998; Schwartz 1995 ; Sekiguchi u. Frank 1999). Zellen dieser Entwicklungsstufe sind an der Zelloberfläche für die Cluster of Differentiation (CD) 19 und im Zytoplasma CD22 positiv, was einem frühen Marker der B-Reihe entspricht. Das nachfolgende Rearrangement des Ig-Leichtkettengens führt zur Entstehung der unreifen B-Zelle, die Antikörper vom Typ IgM bildet und in ihrer Zellmembran verankert (Coupland et al. 2000). Je nachdem ob bei dem Rearrangement V- κ oder V- λ Leichtkettengene erfolgreich kombiniert worden sind, tragen die membranständigen IgM der unreifen B-Zelle μ -Ketten mit κ - oder λ - leichten Ketten in der Membran.

Im Stadium der unreifen B-Zelle werden autoreaktive B-Zellen durch Apoptose oder durch Anergisierung eliminiert (Benschop u. Cambier 1999). B-Zellen, die sich durch eine fehlende Autoreaktivität auszeichnen, besiedeln in der Folge, nach Verlassen des Knochenmarks, sekundäre nichtthymische lymphatische Gewebe wie Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Peyer`sche Plaques.

Durch CD4+ T-Helferzellen des lymphatischen Gewebes aktivierte B-Zellen können sich zu Plasmazellen differenzieren und in grosser Zahl Immunglobuline bilden, bzw. in die primären Follikel einwandern, wo sie durch Umlagerung von follikulären dendritischen Zellen Keimzentren bilden können. Die follikulären dendritischen Zellen scheinen für eine adäquate immunologische Funktion im Hinblick auf die Antikörperbildung eine wichtige Rolle zu spielen (Coupland et al. 2000). Sie können mit dem Blutstrom herangetragene Antigene in ihrer nativen Konformation binden, für lange Zeiträume speichern und sind somit möglicherweise an der Entstehung von B-Gedächtniszellen beteiligt. Nach erfolgter Affinitätsreifung im Rahmen der Keimzentrumsreaktion kommt es zum Klassenwechsel des Immunglobulins. Die Affinitätsreifung erfolgt durch den Mechanismus der somatischen Hypermutation (Jacobs u. Bross 2001), bei der Punktmutationen und gelegentlich auch Duplikationen oder Deletionen in die variablen Abschnitte des Immunglobulin Schwer- oder Leichtkettengens eingefügt werden (Dahlenborg et al. 2000).

Bei manchen Mutationen kommt es zu einer Änderung der Sequenz der betroffenen Basentriplets und damit der durch sie kodierenden Aminosäuren, wodurch die Affinität des B-Zellrezeptors (BCR) gegenüber einem spezifischen Antigen gesteigert oder verringert werden kann. Durch Rückkopplungsmechanismen in Abhängigkeit von der Rezeptoraffinität kann die Apoptose eingeleitet oder die weitere Proliferation jener B-Zellen angeregt werden,

deren BCR eine Affinitätssteigerung erfahren haben (*Berek u. Ziegner 1993; Cook u. Tomlinson 1995; Nemazee et al. 2000; Rolink et al. 2001*).

1.3 Prognostische Parameter bei der B-CLL

Da sich der klinische Verlauf der B-CLL sehr heterogen darstellt und anhand von klinischen bzw. Laborparametern und morphologischen Merkmalen der Tumorzellen bei Diagnosestellung nur in unbefriedigendem Umfang der individuelle Krankheitsverlauf vorhergesagt werden kann, besteht die Notwendigkeit, zusätzliche Faktoren für eine Aussage über die Prognose bei der B-CLL zu gewinnen.

Derzeit werden verschiedene Parameter wie die Lymphozytenverdopplungszeit (*Montserrat et al. 1986*), der Serumspiegel von β 2-Mikroglobulin (*Di Giovanni et al. 1989*) und der Thymidinkinase (*Kallander et al. 1984; Hallek et al. 1999*) sowie das Muster der Knochenmarkinfiltration (*Rozman et al. 1984*), genomische Aberrationen (*Juliusson et al. 1991; Döhner et al. 2000*), der Mutationsstatus der variablen Anteile der Immunglobulin Schwereketten Gene (VH-Mutationsstatus) (engl. variable heavy genes) (*Hamblin et al. 1999; Damle et al. 1999; Kröber et al. 2002*) sowie die Expression von CD38 und der Tyrosinkinase ZAP-70 (*Damle et al. 1999; Crespo et al. 2003; Orchard et al. 2004; Rassenti et al. 2004*) hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung evaluiert.

1.3.1 VH-Mutationsstatus

Der Prozeß der somatischen Hypermutation der variablen Anteile der Immunglobulin Schwereketten Gene findet physiologischerweise in lymphatischen Keimzentren statt (*Hummel et al. 1994; Schwartz 1995; Küppers et al. 1999*). Die somatische Hypermutation der VH-Gene gilt als Indiz dafür, dass B-Zellen die Reifungsstufe des Keimzentrums durchschritten haben.

Traditionell wurde die B-CLL als „Präkeimzentrumslymphom“ mit unmutierten VH-Genen angesehen, allerdings konnten in den vergangenen Jahren in ungefähr der Hälfte der Fälle somatische Mutationen der rearrangierten VH-Gene nachgewiesen werden (*Schroeder et al. 1994; Fais et al. 1998*). Es zeigte sich eine erhebliche klinische Bedeutung des VH-Mutationsstatus, wobei die B-CLL Subgruppe mit unmutierten VH-Genen einen

ungünstigeren Krankheitsverlauf als die Subgruppe mit mutierten VH-Genen aufwies (*Hamblin et al. 1999, Damle et al. 1999; Kröber et al. 2002*).

Über die biologischen Hintergründe der prognostischen Bedeutung des VH-Mutationsstatus ist derzeit wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass spezifische VH-Gene in den beiden Subgruppen überrepräsentiert sind (V1-69 bei unmutierter CLL, V4-34 bei mutierter CLL) (*Fais et al. 1998; Kröber et al. 2002b; Stevenson et al. 2004*). Spezifische VH-Gene wie V3-21 und V3-23 scheinen unabhängig vom VH-Mutationsstatus mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein (*Tobin et al. 2003; Kröber et al. 2002b*). Diese Befunde könnten Ausdruck einer antigen- bzw. superantigenabhängigen Selektion spezifischer V-D-J-Umlagerungen durch B-Zellrezeptor vermittelte Signalwege bei der B-CLL sein.

1.3.2 Genomische Aberrationen

Genomische Aberrationen haben einen erheblichen Stellenwert unter den prognostischen Parametern bei der B-CLL erlangt. Die häufigste Aberration stellt die Deletion 13q dar, gefolgt von der Deletion an Chromosom 11q, der Trisomie 12q und der Deletion 17p (*Döhner et al. 2000*).

Zu den wichtigsten unabhängigen Prognosefaktoren gehören die Deletionen 11q und 17p, welche mit kurzen Überlebenszeiten, im Falle von 17p mit einem medianen Überleben von 32 Monaten und bei der Deletion 11q mit 79 Monaten, assoziiert sind. Im Gegensatz dazu zeigt die Deletion 13q eine deutlich bessere Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von 133 Monaten (*Döhner et al. 1997; Döhner et al. 1999; Döhner et al. 2000*).

Bei der Deletion 17p13.1 scheint ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 und der Pathogenese zu bestehen. TP53 codiert für das Protein p53, das als Antwort auf eine DNA-Schädigung überexprimiert wird und den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus hemmt. Desweiteren zeigten Patienten deren B-CLL Zellen eine Deletion 17p13.1 aufwiesen ein fehlendes Ansprechen auf Chemotherapie und somit eine kurze Lebenserwartung (*Döhner et al. 1995; el Rouby et al. 1993; Gaidano et al. 1994; Meinhardt et al. 1999*).

Bei Patienten mit 11q Deletionen konnte mittels Interphase-Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH-Analyse) eine gehäuft auftretende Chromosomendeletion der Banden 11q22-q23, in der Region des ATM-Gens (mutated-in-ataxia-teleangiectasia Gen) nachgewiesen werden. Betroffene zeigten einen aggressiveren Verlauf und auch eine schlechtere Überlebensrate. Ebenfalls wiesen Betroffene der Ataxia teleangiectatica als besonderes Merkmal dieser Erbkrankheit eine ausgeprägte Disposition für

lymphoproliferative Erkrankungen, was eine Beteiligung des ATM-Gens als Tumorsuppressorgen für die Ätiologie der B-CLL nahe legt (*Stilgenbauer et al. 1997; Schaffner et al. 1999; Haidar et al. 2000; Döhner et al. 2000*).

Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit 13q14 Deletionen als solitäre Aberrationen häufig mutierte VH-Gene ohne Affektion des p53 und benötigen bei langem Überleben keine Therapie (*Döhner et al. 2000; Stilgenbauer et al. 2002; Lin et al. 2002*).

Zwischen genomischen Aberrationen und dem VH-Mutationsstatus liegt ein Zusammenhang vor, da prognostisch ungünstige Aberrationen wie die Deletionen 11q und 17p wesentlich häufiger in der VH-unmutierten Subgruppe und günstige Aberrationen wie die Deletion 13q14 in der VH-mutierten Subgruppe auftreten. Dennoch scheinen basierend auf multivariaten Analysen VH-Mutationsstatus und genomische Aberrationen unabhängige Marker zur Prognoseabschätzung zu sein (*Oscier et al. 2002; Lin et al. 2002; Kröber et al. 2002*).

1.3.3 ZAP-70 - Expression und Quantifizierungsmöglichkeit

Das zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70) ist eine Tyrosinkinase aus der Gruppe der Syk-Kinasen, die dem CD3-Rezeptor der T-Zellen assoziiert ist. Sie ist durch 2 tandem Src homology 2 (SH2) Domänen und einer C-terminalen katalytischen Domäne charakterisiert. (*Taniguchi et al. 1991; Chan et al. 1992*).

Als Erstes wurde die Funktion von ZAP-70 als Enzym bei T-Zellen beschrieben. Hier werden nach Ligation des T-Zellrezeptors (TCR) und Aktivierung von Proteinkinasen der Src-Familie (Lck und Fyn) tyrosinhaltige ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) phosphoryliert und ZAP-70 durch Rekrutierung an diese aktiviert. ZAP-70 ist hier an den zentralen Schaltstellen der Signaltransduktion der T-Zelle in den physiologischen Aktivierungsprozess dieser immunologischen Einheit eingeschaltet.

Das aktivierte ZAP-70 kann mit Hilfe seiner katalytischen Region unter ATP-Spaltung Substrate phosphorylieren und nimmt so die Schlüsselposition in der Einleitung weiterer Signalkaskaden ein (Ras/Fos-Weg, der Weg über die TEC-Kinasen mit Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) und dem Rho-pathway; Desweiteren über die direkte Aktivierung der PLC- γ /Ca⁺⁺, des Diacylglycerin (DAG)/Proteinkinase C (PKC) Wegs und dem Inositoltriphosphat (InsP3) Weg) (*Chen et al. 2002*), an deren Ende mittels Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen aktiviert wird, die für Zytokine und/oder Effektormoleküle kodieren.

Über wachstumsstimulierende Zytokine wie Interleukin (IL-) 2 werden T-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus überführt und die klonale Proliferation eingeleitet. Desweiteren werden

die Migration, Adhäsion und die Actinreorganisation beeinflusst (*Reth 1989; Bolen u. Brugge 1997*). In T-Zellen konnte durch Inaktivierung von ZAP-70 Anergie oder Apoptose ausgelöst werden.

Auch bei der B-CLL konnte für ZAP-70 eine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden. Die Stimulierung des BCR über membranständiges IgM führte bei VH-unmutierten CLL-Fällen mit ZAP-70 Expression zur Phosphorylierung von ZAP-70 und zytoplasmatischen, proliferationsassoziierten Proteinen während in VH-mutierten CLL-Fällen in der Mehrzahl keine Signaltransduktion über IgM ausgelöst werden konnte (*Lanham et al. 2003; Chen et al. 2002*).

Dies ist ein Hinweis dafür, dass der BCR-Signaltransduktionsweg bei ZAP-70 exprimierenden VH-unmutierten B-CLL-Zellen intakt ist und dass ZAP-70 hier funktionell in den BCR-Signaltransduktionsweg involviert ist (*Chen et al. 2002; Chen et al. 2005*).

Bei den auf die Frage nach zusätzlichen prognostischen Parametern durchgeführten vergleichenden Genexpressionsuntersuchungen zeigten die meisten der 240 differentiell exprimierten Gene, der VH-mutierten und VH-unmutierten Subgruppen, nur geringe Unterschiede (*Rosenwald et al. 2003; Klein et al. 2001*). In Microarray-Analysen konnte das Gen für ZAP-70 als eines der zwischen den beiden Subgruppen am stärksten differenziell exprimierte Gene identifiziert werden (*Wiestner et al. 2003; Rosenwald et al. 2001; Klein et al. 2001*).

Das für ZAP-70 kodierende Gen wurde in der VH-unmutierten Subgruppe, in der auch die prognostisch ungünstigeren Aberrationen wie die Deletionen 11q und 17p wesentlich häufiger auftraten, überexprimiert und lässt daher die Verwendung als Surrogatmarker für den VH-Mutationsstatus als vielversprechende Möglichkeit erscheinen. Hiermit könnte auf die schwierige, zeitaufwändige und kostspielige Notwendigkeit der VH-Gensequenzierung verzichtet werden. (*Rosenwald et al. 2001; Klein et al. 2001; Crespo et al. 2003*).

Um eine zuverlässige Aussage hinsichtlich der Rolle von ZAP-70 treffen zu können, stellte sich im Vorfeld die Frage nach einer geeigneten Methode zur Quantifizierung von ZAP-70 oder assoziierten Zellprodukten, die dem Anspruch auf hohe Spezifität gerecht wird. Um eine quantitative Angabe hinsichtlich der Expression von RNA, z.B. mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder des translatierten Proteins durch den Western Blot, machen zu können, besteht vor einer Quantifizierung die Notwendigkeit einer Anreicherung von B-CLL Zellen bzw. Abtrennung von T-Zellen, da ZAP-70 physiologischerweise von T-Zellen exprimiert wird und somit zu falsch hohen Expressionswerten führen würde.

Als Alternative hierzu stellen durchflußzytometrische Analysen nach Immunphänotypisierung eine geeignete Methode dar, da hierbei eine Quantifizierung der ZAP-70 Expression in definierten zellulären Subgruppen, im vorliegenden Fall die Unterscheidung der Expressionsstärke in physiologischen T-Zellen und pathologischen B-CLL Zellen, möglich ist. Aus diesem Grunde wurden international verschiedene durchflußzytometrische Strategien entwickelt und im Rahmen von retrospektiven Studien an heterogenen Patientenkollektiven evaluiert. In diesen Untersuchungen konnte die Assoziation zwischen ZAP-70 Expression und VH-Mutationsstatus sowie ZAP-70 Expression und einem ungünstigen Krankheitsverlauf bestätigt werden (*Crespo et al. 2003; Orchard et al. 2004; Rassenti et al. 2004*).

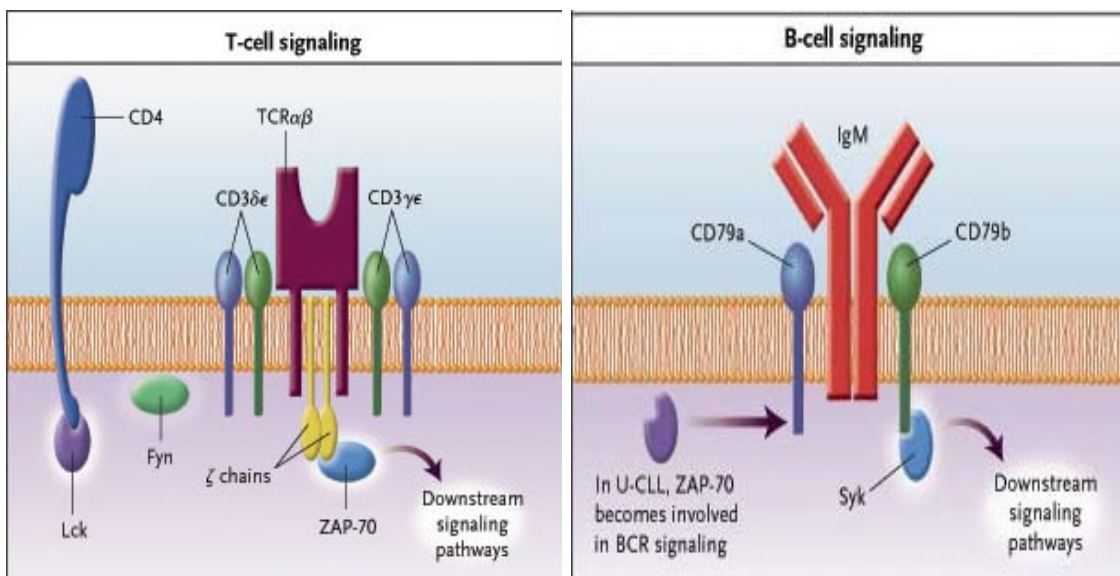


Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Rolle des zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) in der Signalkaskade bei T-Zellen (links) und variable-heavy gene (VH-) unmutierten B-CLL Zellen (U-CLL/rechts). Die Stimulierung des B-Zellrezeptors über membranständiges IgM führte bei VH-unmutierten B-CLL Fällen mit ZAP-70 Expression zur Phosphorylierung von ZAP-70 und zytoplasmatischen proliferationsassoziierten Proteinen (nach Hamblin TJ, N Engl J Med 2004).

1.4 Fragestellungen der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte an einem gut charakterisierten Patientenkollektiv der Zusammenhang zwischen ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus und zusätzlichen genetischen Hochrisikofaktoren wie V3-21 Genbenutzung und genomischen Aberrationen wie 11q oder 17p Deletion bei CLL untersucht werden.

Abschliessend sollte die Frage nach der prognostischen Bedeutung der ZAP-70 Expression, des VH-Mutationsstatus, dem Auftreten der V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Genomaberrationen in univariaten und multivariaten Analysen betrachtet werden.

Auf diese Weise sollten unabhängige prognostische Parameter bei der B-CLL ermittelt und das untersuchte Patientenkollektiv in verschiedene Risikogruppen eingeteilt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Kollektiv von 148 Patienten, die an B-CLL erkrankt waren und in der Abteilung für Innere Medizin III der Universität Ulm behandelt und nachbetreut wurden, betrachtet.

Klinische Daten waren in 139 Fällen vorhanden und das mittlere Alter zum Diagnosezeitpunkt betrug 57 Jahre, mit einer Schwankungsbreite zwischen 25 und 79 Jahren. Von den 148 Patienten waren 80 männlich und 68 weiblich, was einem Verhältnis von 1.84 entspricht. Zum Diagnosezeitpunkt befanden sich 86 (65%) der Patienten im Stadium A, 35 (27%) im Stadium B und 11 (8%) im Stadium C nach Binet (*Binet et al. 1981*). In 16 der diagnostizierten Fälle lag keine Stadieneinteilung nach Binet vor.

Für die vorliegende Arbeit wurden alle Patientenproben auf ihre ZAP-70 Expression hin untersucht. Das mittlere Zeitintervall zwischen Diagnose und der ZAP-70-, VH- und FISH-Analyse betrug 28, 26 und 26 Monate, mit einer Variationsbreite zwischen 0 und 260 Monaten. Analysen des VH-Mutationsstatus lagen in 133 Fällen vor, von denen 53 (40%) mutiert und 80 (60%) unmutiert waren. Eine V3-21 Genbenutzung lag bei 16 Fällen vor und FISH-Analysen, die wie bei Döhner (*Döhner et al. 2000*) durchgeführt wurden, waren in 144 Fällen vorhanden, von denen 104 Aberrationen zeigten.

Zum Zeitpunkt der ZAP-70 Analyse waren 72% der Patienten unbehandelt. Während der Nachbeobachtungszeit erhielten 86 Patienten eine Therapie und 23 Patienten waren in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 53 Monaten verstorben.

2.2 Chemikalien und sonstige Materialien

Beckman Coulter,
Krefeld, Deutschland Coulter

Ac.T 5 diff AL

Beckman Coulter

Intra Prep, Fix und Perm-Kit,
Fixations/Permeabilisations Reagenz

Beckman Coulter	Ak anti-CD19-ECD clone HD237
Beckman Coulter	Ak anti-CD5-PC5 clone BL1a
Beckman Coulter	Coulter Clone, Cyto-stat, Ak Kontrolle ECD
Beckman Coulter	Durchflusszytometer EPICS XL-MCL
Biochrom, Berlin	FCS, RPMI 1640 Medium Biocoll Separating Solution
Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	Falcon Tubes 15ml, 50ml
BD Bioscience	Ak Kontrolle PE
BD Bioscience	Ak anti-CD3-PE clone SK7
BD Bioscience	Ak anti-CD56-PE clone My 31
Corning Inc., Corning, NJ, USA	Costor Stripette 25ml
Dako Cytomation, Heidelberg, Deutschland	Ak goat-anti-Mouse FITC
Dako Cytomation	Maus Serum
Eppendorf, Hamburg	Pipetten 1000µl, 100µl, 50µl, 10µl, 2µl Pipettenspitzen 1000µl, 100µl, 50µl, 10µl, 2µl Tubes 3ml, 5ml
Gibco, Paislay, Scotland, UK	PBS
Heidolph	Reax 2000 Vortexer
Heraeus Instruments GmbH, Unterschleissheim	Dade Serocent Zellwaschzentrifuge
Heraeus Instruments GmbH, Unterschleissheim	Multifuge 3s-R
Hirschman Laborgeräte	Pipetus
Immunotech	Ak MsIgG unkonjugiert
Immunotech	Ak Kontrolle PC5
Köttermann Labortechnik, Vetze-Hünsingen	Wasserbad

Merck, Darmstadt	DMSO
Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA	10ml Pipette
Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargmünd	BSA
Sorstedt, Numbrecht	FACS-Tubes
Upstate; Biomol, Hamburg, Deutschland	Ak anti-ZAP-70 clone 2F3.2
Vacuubrand GmbH, Wertheim	Membran Vacuumpumpe

2.3 Ermittlung der ZAP-70 Expression mittels Durchflusszytometrie.

2.3.1 Immunphänotypisierung und fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS)

Die Immunphänotypisierung ist eine in der Medizin, insbesondere der Hämatologie, Immunologie und Biologie angewandte Methode zur Analyse der Expression verschiedener intrazellulärer und membranständiger Antigene.

Aus dem Expressionsmuster dieser Antigene lassen sich Rückschlüsse auf Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellreihe und den Differenzierungsgrad der Zellen ziehen. Besondere Bedeutung hat die Immunphänotypisierung bei der Klassifikation von Leukämien, insbesondere der ALL, der AML, der CLL und den Non-Hodgkin-Lymphomen.

Mit Hilfe markierter monoklonaler Antikörper wird das Antigenprofil der entsprechenden Zellen bestimmt. Bei vielen der untersuchten Antigene handelt es sich um in der CD-Nomenklatur erfasste Leukozyten-Antigene. Die Immunphänotypisierung erfolgt meist an Zellsuspensionen. Das am häufigsten angewandte Verfahren zum Nachweis der einzelnen Antigene ist die Durchflußzytometrie oder auch fluoreszenzakivierte Zellanalyse (FACS-Analyse).

Durch FACS ist es möglich, mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (Ak)-markierte Zellen quantitativ zu bestimmen und sie auf diese Weise in einzelne Populationen zu unterteilen. Zur Analyse werden die markierten Einzelzellen suspendiert, in

eine Messküvette gegeben und in einer Trägerflüssigkeit an einem fokussierten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeführt. Die dabei durch den Laser angeregten Fluorochrome absorbieren hierbei über einen vergleichsweise weiten, für sie jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich die Energie des Lasers. Durch diese Energie werden Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch Anregung auf ein höheres Energieniveau gehoben, wobei sie beim Rücksprung zum Grundniveau Energie in Form von Photonen emittieren.

Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Diese Photonen werden von Photodetektoren in elektrische Pulse konvertiert, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korreliert und die im Anschluss in auf dem Computer dargestellte Messpunkte umgewandelt werden. Hierdurch kann der Anteil der, für das zu messende intrazelluläre bzw. Oberflächenantigen, positiven Zellen in dieser Probe ermittelt werden. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgrösse und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Grösse des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen, wodurch im Vorfeld eine Unterteilung z.B. in Lymphozyten oder Granulozyten ermöglicht wird.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar teilweise bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

2.3.2 Aufbereitung der Patientenproben

Je nach Verfügbarkeit, wurde ZAP-70 entweder in frischen Blutproben oder anhand von mononukleären Zellen, die in Dimethylsulfoxid- (DMSO) haltigem Medium in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert worden waren, bestimmt. Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Patientenproben mussten zur Aufbereitung in einem 37°C warmen Wasserbad aus den zur Aufbewahrung verwendeten Eppendorf-Röhrchen gelöst und danach schonend unter ständiger Zugabe von FCS-PBS Medium mit einem Gesamtvolumen von 10 ml über 10 Minuten aufgetaut werden.

An einer Testserie von Patientenproben wurde neben der regulären Färbung der Patientenproben zusätzlich eine Apoptosefärbung mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) vorgenommen. 7-AAD zeichnet sich durch die Besonderheit aus, dass es spezifisch zwischen Cytosin und Guanin der DNA von "toten" Zellen interkaliert und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. 7-AAD kann ausschliesslich in Zellen ohne intakte Zellmembran eindringen und eignet sich daher mit hoher Zuverlässigkeit zur

Apoptosefärbung. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil avitaler Zellen im Vergleich mit frischen Blutproben höher lag. Zur Verringerung des Anteils apoptotischer Zellen wurde eine Versuchsanordnung getestet in der mehrere kryokonservierte Proben der gleichen Patienten verglichen wurden, bei denen jedoch zum Teil vorher eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt worden war. Die 7AAD-Färbung zeigte bei den Proben nach Ficoll Aufreinigung einen niedrigeren Anteil an avitalen Zellen und die jeweiligen Zellverbände in der Dot-plot Darstellung ergaben distinktere Populationen.

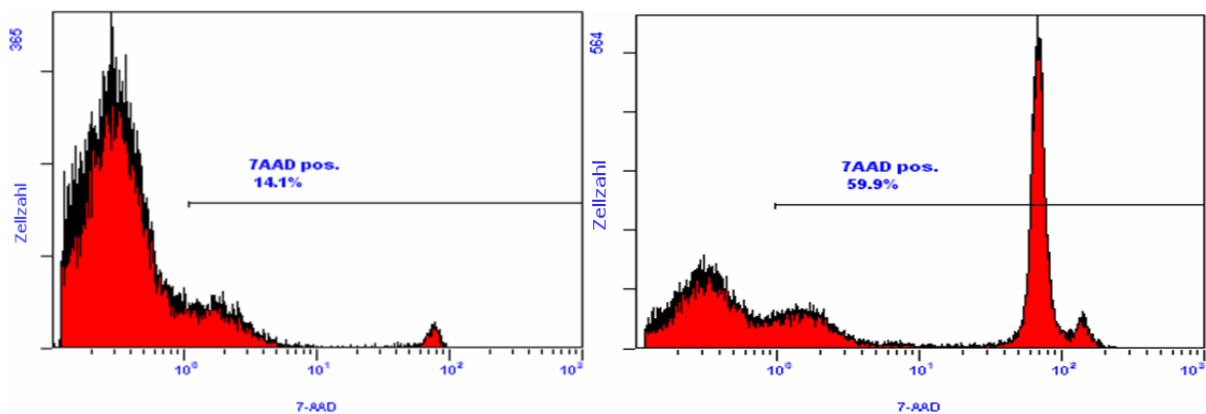


Abbildung 2: Kryokonservierte Patientenproben nach dem Auftauen und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) Färbung. Auf der X-Achse dargestellt sind die 7-AAD positiven Zellen in logarithmischer Skalierung. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Zellen dargestellt. Links die Probe nach Ficoll mit einem Anteil an apoptotischen Zellen von 14.1%. Die rechte Probe stammt von dem gleichen Patienten, hier wurde jedoch kein Ficoll durchgeführt. Der Anteil der apoptotischen Zellen betrug hier 59.9%.

Die Aufreinigung durch Ficoll wurde anschliessend bei allen kryokonservierten Proben durchgeführt. Hierfür wurden die Zellpellets nach dem Auftauen vorsichtig mit der Costor Stripette über 10ml Biocoll Separating Solution in die verwendeten Ficolltubes geschichtet. Alle Proben wurden bei 2800 Umdrehungen pro Minute in der Multifuge 3s-R von Heraeus Instruments über 20 Minuten zentrifugiert.

Danach wurde das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen und bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um die verbliebene Biocoll Separating Solution von den Zellen zu trennen; der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet erneut 10 Minuten in 10ml PBS bei 1200 rpm zentrifugiert. Durch die so erreichte Abtrennung des Zelldebris und der toten Zellen konnte ein höherer Reinheitsgrad der Zellen gewährleistet und der Grad unspezifischer Färbungen verringert werden, wodurch bei der Auswertung eine genauere Bestimmung des Grenzbereichs zur Identifikation der ZAP-70 positiven bzw. negativen Zellen ermöglicht wurde.

Aufgetaute Patientenprobe ohne Ficoll Aufreinigung

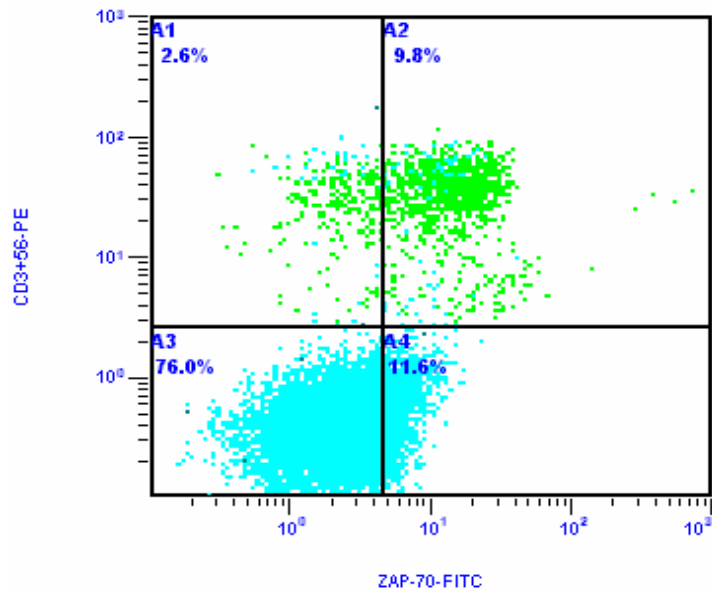


Abbildung 3: Durchflusszytometrische Messung nach Crespo et al. *N Eng J Med.* 2003. Aufgetaute Patientenprobe ohne vorherige Ficoll Aufreinigung. Abgebildet ist die Dot-plot Darstellung der Messpunkte. Auf der y-Achse aufgetragen sind die Cluster of Differentiation (CD)3/56-Phycoerithrin (PE) positive Signale, auf der x-Achse aufgetragen sind die Fluorescein-isothiocyanate (FITC) positive Signale für das zeta-associated protein of 70 kilo Dalton ZAP-70.

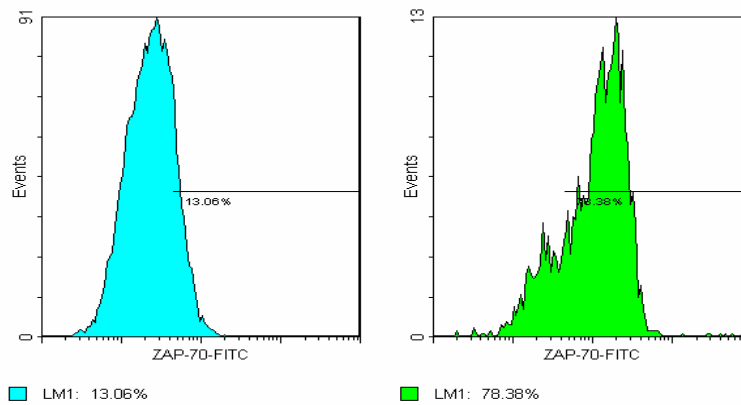


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Messung nach Crespo et al. *N Eng J Med* 2003. Aufgetaute Patientenprobe ohne vorherige Ficoll Aufreinigung. Abgebildet sind die gleichen Messwerte wie in Abbildung 3, jedoch als Histogramm Darstellung.

Aufgetaute Patientenprobe nach Ficoll Aufreinigung

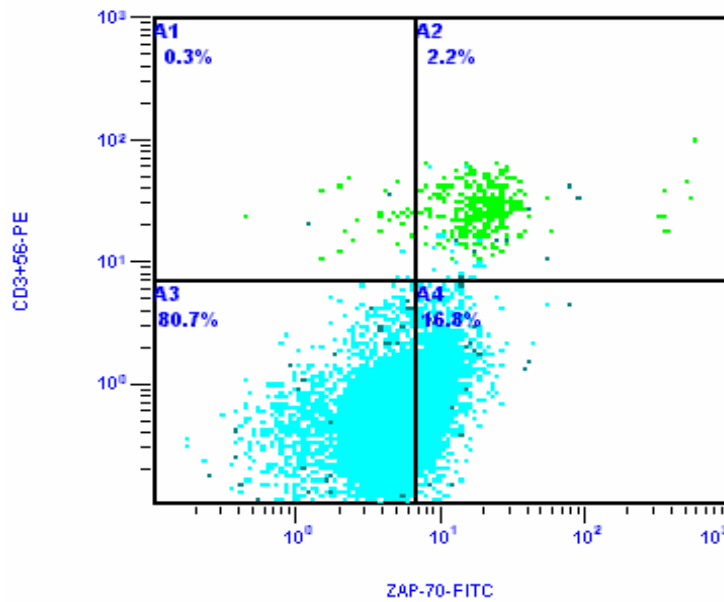


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung nach *Crespo et al. N Eng J Med 2003*. Aufgetaute Patientenprobe nach Ficoll Aufreinigung. Abgebildet ist die Dot-plot Darstellung der Messpunkte. Auf der y-Achse aufgetragen sind die Cluster of Differtiation (CD)3/56-Phycoerithrin (PE) positive Signale, auf der x-Achse aufgetragen sind die Fluorescein-isothiocyanate (FITC) positiven Signale für das zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70).

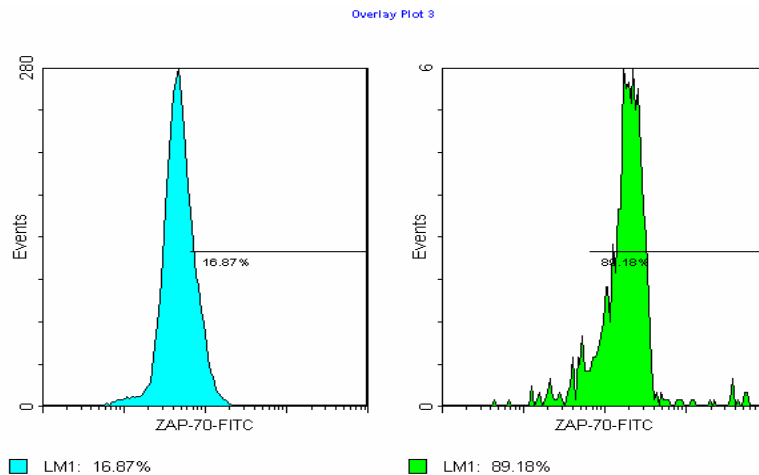


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung nach *Crespo et al. N Eng J Med 2003*. Aufgetaute Patientenprobe nach Ficoll Aufreinigung. Abgebildet sind die gleichen Messwerte wie in Abbildung 5, jedoch als Histogramm Darstellung.

2.3.3 Für die Immunphänotypisierung verwendete Antikörper

Um die Zellen zu charakterisieren und somit in die jeweilige Zellpopulation einordnen zu können, wurden Ak gegen die bei B-CLL Tumorzellen koexprimierten B-Zell Epitope CD5 und CD 19 eingesetzt, sowie Ak gegen das in B-CLL Tumorzellen auftretende ZAP-70. Zur Darstellung der T-Zellpopulation wurden Ak gegen die T-Zell Epitope CD3 und CD56 und gegen das bei T-Zellen physiologische ZAP-70 verwendet.

Für die Analyse wurden folgende Ak verwendet:

Kontrollantikörper:

- 1) unconjugiertes MsIgG (Isotypkontrolle IgG2a/ Immunotech) Primärantikörper.
- 2) Für die Negativkontrolle: MsIgG2 PE (BD Bioscience), MsIgG2b ECD (Cyto-Stat, CoulterClone) und MsIgG1 PC5 (Immunotech).

Verwendete Antikörper für die Zellcharakterisierung:

- 1) Der unconjugierte Anti-ZAP-70 Ak (human) clone 2F3.2 von Upstate als Primärantikörper.
- 2) Der GAM-FITC Ak (Immunglobulin F(ab)2) von Dako Cytomation als Sekundärantikörper gegen MsIgG und Anti-ZAP-70.
- 3) Für die T- und B-Zellen der ZAP-70 Messung jeweils Primärantikörper gegen die entsprechenden Epitope. CD3-PE (clone SK7/ BD Bioscience), CD56-PE (clone My 31/ BD Bioscience), CD19-ECD (clone HD 237/ Beckman Coulter) und CD5-PC5 (clone BL1a/ Beckman Coulter).

2.3.4 Färbung der Patientenproben

Die aufgereinigte Zellprobe wurde in PBS-BSA 3% resuspendiert, wobei die Zellsuspensionen wenigstens 5000 bis maximal 20000 Zellen pro μl nach Zellzählung betragen mussten, um bei der späteren durchflusszytometrischen Analyse genügend Messpunkte zu erhalten.

Zwei Ansätze mit jeweils 50 μl Zellsuspension wurden vorbereitet: eine Negativkontrolle und eine ZAP-70 Messung. Beide Ansätze wurden mit fötalem Kälberserum 22% (Ortho-clinical diagnostics) und 100 μl Fixierungsreagenz zur Zellstabilisierung (IntraPrep/ Beckman Coulter) für 15 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde für weitere 5

Minuten mit 100µl Permeabilisationsreagenz (IntraPrep/ Beckman Coulter) inkubiert, um die Zellmembran für die intrazellulär bindenden Anti-ZAP-70 Ak durchgängig zu machen.

Im weiteren Verlauf folgte die Markierung dieser fixierten und permeabilisierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die mit den Farbstoffen Fluorescein-isothiocyanate (FITC), Phycoerithrin (PE) und Energy Coupled Dye (ECD) conjugiert waren. Dafür wurde die Zellsuspension der Negativkontrolle mit 5µl unconjugiertem MsIgG Primärantikörper und die Zellsuspension die auf ZAP-70 Expression untersucht werden sollte mit 5µl unconjugiertem Anti-ZAP-70 Primärantikörper der Firma Upstate für 20 Minuten inkubiert. Nach waschen mit PBS-BSA 0.1% wurden beide Ansätze jeweils mit 5µl GAM-FITC Sekundärantikörper gegen den MsIgG Ak und den Anti-ZAP-70 Ak für 20 Minuten inkubiert und währenddessen dunkel gestellt um die Fluoreszenzintensität zu erhalten. Nach weiterem waschen mit PBS-BSA 0.1% folgte die Inkubierung beider Ansätze mit 10µl Maus Serum (Dako) für 10 Minuten im Dunkeln.

Im letzten Schritt wurden zur Negativkontrolle 10µl Mouse IgG2 PE , 5µl Mouse IgG2b ECD und 5µl Mouse IgG1 PC5 und zu der auf ZAP-70 untersuchten Zellsuspension 10µl CD3-PE, 5µl CD56-PE, 10µl CD19-ECD und 10µl CD5-PC5 pipettiert und beide Ansätze für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Abschliessend wurden beide Ansätze mit 0,1% PBS-BSA gewaschen, das Zellpellet in 500µl 0,1% PBS-BSA resuspendiert und gemessen.

2.3.5 Messung der ZAP-70 Expression

Die ZAP-70 Expression wurde nach Crespo (*Crespo et al. 2003*) mittels 4-Farb-Durchflusszytometrie ermittelt und zur Messung der EPICS XL-MCL von Beckman Coulter verwendet.

Um bei der Datenauswertung nur die Zellen von Interesse zu erhalten, wurden in jeder gefärbten Patientenprobe mittels des Forward Scatters (Vorwärtsstreulicht) und des Side Scatters (Seitwärtsstreulicht) die gemessenen Zellen über die Parameterkombination Grösse gegen Granularität eingeteilt, um Monozyten, Zelldebris und Doubletten aus dem Messbereich auszugrenzen und den Messbereich auf die lymphozytären Zellen zu beschränken.

Die verbleibenden lymphozytären Zellen wurden in weiteren Gates nach den, für die Populationen typischen Epitopen eingegrenzt und so die Zellverbände der für B-Zell Epitope CD19-ECD und CD5-PC5 positiven CLL-Zellen und den CD3-PE, CD56-PE und ZAP-70-FITC positiven T- Zellen und natürlichen Killerzellen bestimmt.

Die Negativkontrollen für die Epitopfärbungen wurden in den einzelnen Gates der Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Kontrollantikörper definiert. Dies waren MsIgG-PE/MsIgG-FITC; MsIgG-ECD/MsIgG-FITC; MsIgG-PC5/MsIgG-FITC.

2.3.6 Auswertung der gemessenen ZAP-70 Expression

Die durchflusszytometrisch bestimmten Patientenproben ergaben je positiv gemessener Zelle, d.h. jeder Zelle, die die Vorgaben der Messeinstellungen aus Kapitel 2.3.5. erfüllten, in der Auswertung einen Signalpunkt. Alle erhaltenen Signalpunkte kamen in einer 2-dimensionalen (auf der y-Achse CD3/56 positiv und auf der x-Achse ZAP-70 positiv) Dot-plot Grafik zur Darstellung mit Hilfe derer jede so vermessene Patientenprobe hinsichtlich ihres ZAP-70-positiven B-Zell-Anteils betrachtet werden konnte.

Als Referenz zur Bestimmung des Grenzwertes zwischen ZAP-70 positiven und ZAP-70 negativen B-Zellen, wurde die T-Zell Population herangezogen, die sich physiologischerweise vollständig ZAP-70 positiv darstellt. Um die gemessene Probe als ZAP-70 positiv zu klassifizieren und somit eine prognostische Aussage treffen zu können, war ein ZAP-70 positiver B-Zell Anteil von mindestens 20% festgesetzt worden. Dieser Wert hatte sich in der Studie nach Crespo (*Crespo et al. 2003*) als optimaler Grenzbereich herausgestellt, um eine Aussage über die Prognose treffen zu können, die bei Werten < 20% ZAP-70 positiven B-CLL Zellen als günstig bzw. bei Werten > 20% ZAP-70 positiven B-CLL Zellen als ungünstig zu betrachten ist.

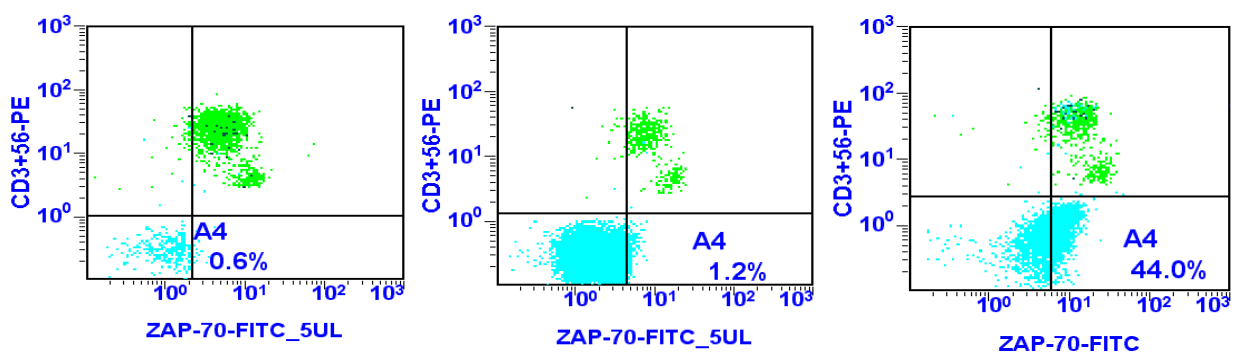


Abbildung 7: Abgebildet sind die in den Messeinstellungen definierten und nach den einzelnen Zellverbänden eingestellten Zellpopulationen. Farblich dargestellt sind die B bzw. B-CLL Zellverbände (blau) und die T- und NK-Zellverbände (grün). Zur Bestimmung des Cut-offs wurde die Cluster of Differentiation (CD)3/56 positive T- und NK-Zellpopulation herangezogen, die sich physiologischerweise ZAP-70 positiv darstellt. Um die gemessene Probe als zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) positive B-CLL zu klassifizieren, wurde ein ZAP-70 positiver B-Zell Anteil von mindestens 20% festgesetzt. **Links:** Gesunde Normalperson mit kleiner B-Zell Population. **Mitte:** ZAP-70 negative B-CLL. **Rechts:** ZAP-70 positive B-CLL. Rechts unten ist jeweils der Prozentsatz ZAP-70 positiver B-CLL-Zellen nach Ausschluss der T- und NK-Zellen angegeben.

2.4 Analyse genomischer Aberrationen und des VH-Status

Die Analyse genomischer Aberrationen war im Vorfeld mit Hilfe der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH), wie bei Döhner (*Döhner et al. 2000*) beschrieben, durchgeführt worden. Die Technik der FISH dient der Erfassung chromosomaler Aberrationen an Metaphase- und Interphase-Zellkernen wobei sich die FISH der genetischen Gesetzmässigkeit bedient, dass sich Einzelstrang-DNA an komplementäre DNA-Sequenzen spezifisch anlagert. Die Ziel-DNA ist dabei die nukleäre DNA von Metaphase und Interphasenzellkernen, die auf einen Objektträger aufgetragen ist und mit einer Test-Sonde detektiert wird. Diese ist meistens durch enzymatische Inkorporation von Biotin- oder Digoxigenin- markierten Nukleotiden oder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (*Döhner et al. 1997; Döhner et al. 1995*). Die derzeit zur Verfügung stehenden Sondentypen sind Zentromer-Sonden, Locus spezifische Sonden und Whole Chromosome Paints.

Die näher untersuchten Chromosomenbereiche des hier betrachteten Kollektivs waren 6q21, 11q13, 11q22-q23, 12q13, 13q14, 17p13 und 14q32. Von den 144 Patientenproben, die mittels der FISH analysiert worden waren, zeigten 104 Aberrationen.

Der VH-Mutationsstatus war in Vorarbeiten bereits in 133 Fällen durch VH-Gensequenzierung, wie bei Kröber (*Kröber et al. 2002*) beschrieben, ermittelt worden. Als Grenzwert zur Unterscheidung zwischen VH-unmutiert und VH-mutiert wurde 98% Sequenzhomologie zum nächstverwandten Keimbahn-Gen ($< 98\%$ VH-mutiert, $\geq 98\%$ VH-unmutiert) verwendet (*Matsuda et al. 1993; Hamblin et al. 1999; Damle et al. 1999; Maloun et al. 2000*).

2.5 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden die Programme R (R Development Core Team 2004) und GraphPad Prism Version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, Californien, USA) verwendet. Als wichtigste Endpunkte für die Statistische Analyse wurden die behandlungsfreie Überlebenszeit (TFS) und die Gesamtüberlebenszeit (OS) ab dem Diagnosezeitpunkt festgesetzt. Unterschiede zwischen TFS und OS Verteilungen wurden hierbei mit Hilfe von Log-Rank Statistiken bestimmt.

Überlebenskurven zur Abschätzung der medianen Überlebenszeit wurden nach der Methode von Kaplan und Meier erstellt (*Kaplan u. Meier 1958*). Die mittlere Nachbeobachtungszeit wurde gemäss der Methode nach Korn (*Korn 1986*) ermittelt. Das Proportional Hazards Regression Model nach Cox (*Cox 1972*) wurde verwendet, um Unterschiede in TFS Zuteilungen unter den Subgruppen zu identifizieren.

Neben den in dieser Arbeit gewonnenen Daten für die ZAP-70 Expression wurden weiterhin als mögliche prognostische Faktoren die bereits im Vorfeld erhobenen zytogenetischen Daten wie 17p und 11q Hochrisiko-Genomaberrationen (*Döhner et al. 2000*), die aus Gensequenzierungen gewonnenen Daten für den VH-Mutationsstatus und das Auftreten von V3-21 Genbenutzung eingeschlossen und zum Vergleich ihrer prognostischen Wertigkeit eine multivariate Analyse nach Cox (*Cox 1972*) durchgeführt.

Fehlende Daten wurden mit einem Verfahren zur multiplen Imputation unter Verwendung der Predictive Mean Matching Methode mit n=100 Imputationen geschätzt (*Harrell 2001*). Kategorielle Werte wurden mit dem Fisher Exact Test analysiert. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner 0.05 erreicht. Um quantitative Informationen über die Relevanz der Ergebnisse zu geben wurden die 95% Konfidenz-Intervalle (KI) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenhang zwischen ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus und zusätzlichen genetischen Hochrisikomerkmalen wie 11q oder 17p Deletionen und V3-21 Genbenutzung.

Bei der Auswertung der gewonnenen Daten hinsichtlich des Zusammenhang zwischen ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus und zusätzlichen genetischen Hochrisikomerkmalen wie 11q oder 17p Deletionen und V3-21 Genbenutzung zeigte sich nach Immunphänotypisierung in der durchflusszytometrischen Analyse bei 65 von 148 Fällen (44%) eine ZAP-70 Expression von weniger als 20% der analysierten Zellen. Diese wurden deshalb als ZAP-70 negativ betrachtet, wohingegen in 83 von 148 Fällen (56%) eine ZAP-70 Expression bei genau 20% oder mehr der gemessenen Zellen zu sehen war und diese deshalb als ZAP-70 positiv gewertet wurden.

VH-Mutationsanalysen waren in 133 Fällen verfügbar, bei denen die VH-Gene in 53 von 133 Fällen (40%) mutiert und in weiteren 80 Fällen (60%) unmutiert waren. Das V3-21 Gen zeigte ein klonales Rearrangement in 16 von 133 Fällen (12%) und war in 11 von 16 Fällen (69%) mutiert. Genomische Aberrationen wurden in 104 der 144 mittels FISH-Analyse untersuchten Fälle (72%) gefunden. Im Einzelnen waren dies die 13q Deletion als Einzelaberrationen bei 48 der 144 Patienten (33%) von insgesamt 75 nachgewiesenen 13q Deletionen (52%), eine Trisomie 12 wurde in 12 Fällen (8%) gefunden, 11q Deletionen kamen bei 30 Fällen (21%) und 17p Deletionen bei 17 Patienten (12%) vor. In 40 Fällen zeigten sich keine Aberrationen. Übereinstimmungen von ZAP-70 Expression und VH-Mutationsstatus wurden in 100 von 133 Fällen (75%) in den Aufteilungen ZAP-70 negativ/VH-mutiert bei 38 von 53 Fällen (72%) und ZAP-70 positiv/VH-unmutiert bei 62 von 80 Fällen (78%) gefunden.

Diskordanzen waren in 33 von 133 Fällen (25%) mit der Aufteilung ZAP-70 negativ/VH-unmutiert bei 18 von 80 Fällen (23%) und ZAP-70 positiv/VH-mutiert bei 15 von 53 Fällen (28%) vorhanden.

Tabelle 1: Zusammenhang von zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) Expression und variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus bei 133 verfügbaren Fällen. Es zeigt sich eine Konkordanz bei 100 (75%) Fällen und eine Diskordanz bei 33 (25%) Fällen.

	ZAP-70 neg		ZAP-70 pos		
VH mutiert	38	72%	15	28%	53
VH unmutiert	18	23%	62	78%	80
	33	25%	100	75%	133
	Diskordant		Konkordant		

Zur Abschätzung des Zusammenhangs von ZAP-70 Expression und dem VH-Mutationsstatus wurden die erhobenen Daten in verschiedene Kategorien aufgeteilt und im Hinblick auf die ZAP-70 Expression und den VH-Mutationsstatus betrachtet.

Die einzelnen Kategorien waren:

- (1) Alle erhobenen Fälle bei denen eine VH-Mutationsanalyse vorlag (n=133).
- (2) Alle Fälle mit VH-Mutationsanalyse, normalem Karyotyp und ohne V3-21 Genbenutzung (n=36/133). Hier zeigte sich bei nur 8% der Fälle eine Diskordanz (ZAP-70 positiv/VH-mutiert).
- (3) Alle Fälle mit VH-Mutationsanalyse bei denen zusätzlich eine 11q oder 17p Deletion, aber keine V3-21 Genbenutzung vorlag (n=40/133). Es zeigten sich Diskordanzen bei insgesamt 33% dieser Fälle, wovon 3% (ZAP-70 positiv/VH-mutiert) und 30% (ZAP-70 negativ/VH-unmutiert) waren.
- (4) Alle Fälle mit VH-Mutationsanalyse, bei denen eine V3-21 Genbenutzung vorlag (n=16/133). Hier zeigten sich Diskordanzen bei insgesamt 56% der Fälle, wobei 50% (ZAP-70 positiv/VH-mutiert) und 6% (ZAP-70 negativ/VH-unmutiert) waren.

Aus dieser Aufteilung wurde deutlich, dass die diskordanten Fälle vornehmlich in den Kategorien auftraten in denen die Faktoren 11q oder 17p Deletion bzw. eine V3-21 Genbenutzung vorhanden waren (siehe auch folgende Abbildung).

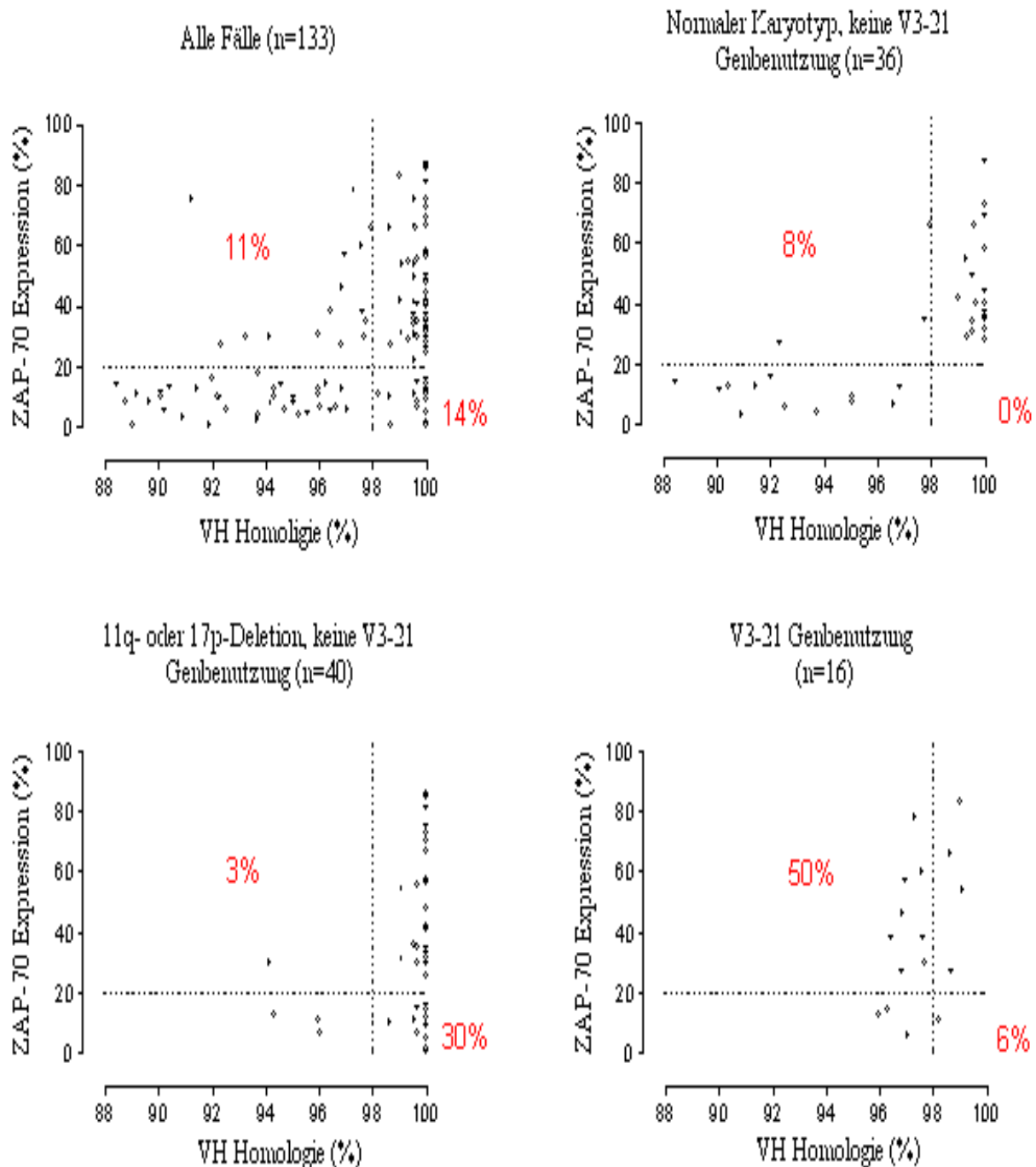


Abbildung 8: Zu sehen sind die Dot-plot Grafiken zur Abschätzung des Zusammenhangs von zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) Expression und dem variable-heavy gene (VH-)Mutationsstatus durch Aufteilung der analysierten CLL-Fälle in separate Gruppen. Der horizontale Cut-off für ZAP-70 liegt bei 20%. Der vertikale Cut-off für den VH-Mutationsstatus liegt bei einer VH-Homologie von 98%. Konkordante Fälle sind im oberen rechten und unteren linken Quadranten, diskordante im oberen linken und unteren rechten Quadranten dargestellt. Angaben zu Diskordanzen innerhalb des jeweiligen Quadranten in %. **Oben links:** Abgebildet sind alle 133/148 Fällen, bei denen eine VH-Mutationsanalyse vorlag. **Oben rechts:** Es sind 36/133 Fällen mit VH-Mutationsanalyse zu sehen, bei denen ein normaler Karyotyp und keine V3-21 Genbenutzung vorlag. Diskordanzen zeigen sich in 8% der abgebildeten Fälle. **Unten links:** Dargestellt sind 40/133 auf VH-Homologie untersuchte Fälle, bei denen zusätzlich eine 11q oder 17p Deletion, aber keine V3-21 Genbenutzung vorlag. Es zeigen sich Diskordanzen von 3% und 30%. **Unten rechts:** Es sind 16 der 133 untersuchten Fälle abgebildet, bei denen zusätzlich eine V3-21 Genbenutzung vorlag. Hier zeigen sich Diskordanzen in 50% und 6%.

Bei Betrachtung der Assoziation von ZAP-70 Expression und dem VH-Mutationsstatus in Subgruppen, die sich durch vorhandene bzw. durch fehlende zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren wie 17p Deletion, 11q Deletion oder V3-21 Sequenzen auszeichneten, zeigten sich auffallende Unterschiede.

Hierbei war der Zusammenhang zwischen der ZAP-70 Expression und dem VH-Mutationsstatus mit einer Konkordanz bei 65 von 76 Fällen, d.h. 86%, signifikant grösser in der Untergruppe ohne zusätzliche genetische Hochrisikomerkmale, während sich in den Untergruppen mit zusätzlichen Hochrisikofaktoren lediglich eine Übereinstimmung bei 34 von 56 Fällen und damit 61% ergab ($p=0.002$).

Tabelle 2: Dargestellt sind 132 Fälle mit genetischen Hochrisikofaktoren bzw. niedrigem genetischen Risiko, die auf ihre Konkordanz (zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) negativ/ variable-heavy gene (VH-) mutiert bzw. ZAP-70 positiv/VH-unmutiert) und Diskordanz (ZAP-70 positiv/VH-mutiert bzw. ZAP-70 negativ/VH-unmutiert) untersucht wurden. Die Gruppe mit niedrigem genetischen Risiko zeigt eine deutlich höhere Konkordanz mit 65/76 Fällen (86%) als die Gruppe mit genetischen Hochrisikofaktoren 34/56 Fällen (61%) ($p=0.002$).

Konkordante Fälle

		ZAP-70 negativ/VH-mutiert		ZAP-70 positiv/VH-unmutiert	
genetische Hochrisikofaktoren	17p- (kein V3-21)	2	10	71%	
	11q- (kein 17p-, kein V3-21)	1	14	65%	34/56 61%
	V3-21	3	4	44%	
niedriges genetisches Risiko	+12q	1	2	60%	
	normal	13	20	92%	
	13q-Einzelaberration	17	11	82%	65/76 86%
	Andere	1	0	100%	

Diskordante Fälle

		ZAP-70 positiv/VH-mutiert		ZAP-70 negativ/VH-unmutiert	
genetische Hochrisikofaktoren	17p- (kein V3-21)	1	4	29%	
	11q- (kein 17p-, kein V3-21)	0	8	35%	22/56 39%
	V3-21	8	1	56%	
niedriges genetisches Risiko	+12q	1	1	40%	
	normal	3	0	8%	
	13q-Einzelaberration	2	4	18%	11/76 14%
	Andere	0	0	0%	

Verglichen mit der VH-mutierten/ZAP-70 negativen Subgruppe kamen Hochrisiko-Aberrationen kennzeichnend häufiger in der VH-unmutierten/ZAP-70 positiven Subgruppe vor (24 von 27 (89%) ($p=0.001$)).

Tabelle 3: Verteilung der Fälle mit konkordanter zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) Expression und variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus unter Berücksichtigung vorhandener oder fehlender zusätzlicher genetischer Hochrisikomerkmale.

<i>Konkordante Fälle</i>			
genetische Charakteristika	ZAP-70 negativ/ VH-mutiert	ZAP-70 positiv/ VH-unmutiert	P-Wert (Fisher Exact Test)
17p- oder 11q- keine V3-21 Genbenutzung (n=13)	3/27 (11%)	24/27 (89%)	0.001
V3-21 Genbenutzung (n=9)	3/7 (43%)	4/7 (57%)	
andere (n=11)	32/65 (49%)	33/65 (51%)	-

Desweiteren war die Verteilung der diskordanten Muster ZAP-70 positiv/VH-mutiert und ZAP-70 negativ/VH-unmutiert eindeutig verschieden sobald Kategorien nach genetischen Hochrisikofaktoren gebildet und untereinander verglichen wurden.

Diskordante Fälle mit 11q oder 17p Deletionen aber ohne V3-21 Genbenutzung waren fast ausschliesslich, d.h. in 12 von 13 Fällen (92%) ZAP-70 negativ und VH- unmutiert, wohingegen die diskordanten Fälle mit vorhandenem V3-21 Rearrangement fast ausschliesslich ZAP-70 positiv und VH-mutiert waren (bei 8 von 9 Fällen (89%) ($p<0.001$)).

Weiterhin konnte unter den diskordanten Fällen ohne 11q oder 17p Deletion und ohne V3-21 Genbenutzung ein ausgewogenes Verteilungsmuster beobachtet werden. Hier zeigte sich eine Verteilung von ZAP-70 negativ/VH-unmutiert bei 5 von 11 Fällen (45%) gegenüber ZAP-70 positiv/VH-mutiert bei 6 von 11 Fällen (55%).

Tabelle 4: Verteilung der Fälle mit diskordanter zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) Expression und variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus unter Berücksichtigung vorhandener oder fehlender zusätzlicher genetischer Hochrisikomerkmale.

<i>Diskordante Fälle</i>			
genetische Charakteristika	ZAP-70 negativ/ VH-unmutiert	ZAP-70 positiv/ VH-mutiert	P-Wert (Fisher Exact Test)
17p- oder 11q- keine V3-21 Genbenutzung (n=13)	12/13 (92%)	1/13 (8%)	<0.001
V3-21 Genbenutzung (n=9)	1/9 (1%)	8/9 (89%)	
andere (n=11)	5/11 (45%)	6/11 (55%)	-

3.2 Prognostische Bedeutung von ZAP-70 Expression und VH-Status in univariaten Analysen.

Bei der Analyse der prognostischen Bedeutung von ZAP-70 Expression und VH-Mutationsstatus in univariaten Analysen zeigte sich, dass das mediane TFS der ZAP-70 positiven Untergruppe mit 24 Monaten im Gegensatz zu der ZAP-70 negativen Untergruppe mit 50 Monaten ($p=0.005$) signifikant kürzer war.

Erwartungsgemäss zeigte das mediane OS der ZAP-70 positiven Untergruppe mit 100 Monaten im Vergleich mit dem OS der ZAP-70 negativen Untergruppe, in der der letzte nachgewiesene Todesfall nach 76 Monaten beobachtet worden war, was einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 85% entspricht, deutlich schlechtere Überlebensraten ($p=0.004$).

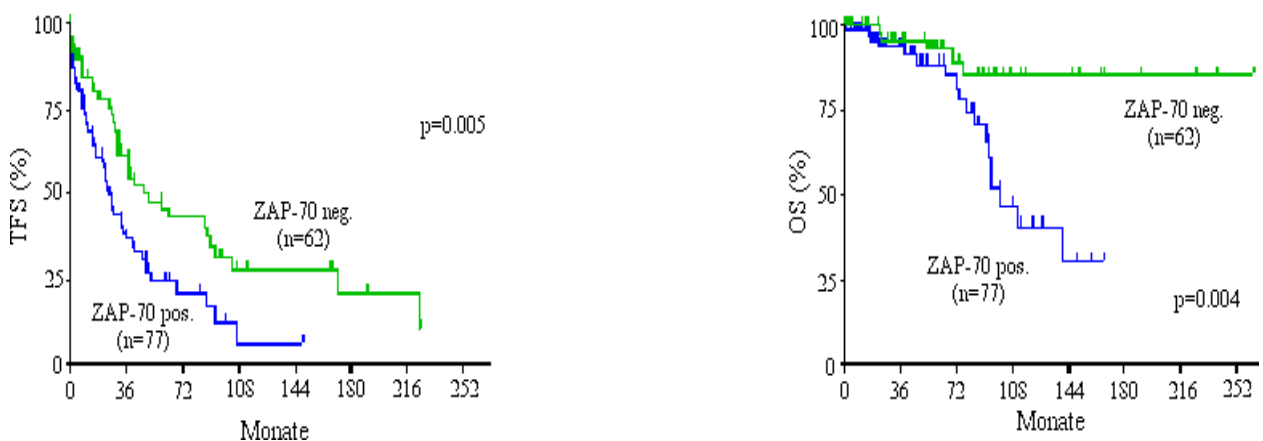


Abbildung 9: Überlebenszeit ohne Therapie (TFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) im Hinblick auf die zeta-assoziiertes Protein von 70 Kilo Dalton (ZAP-70) Expression. Im Diagramm für den TFS beträgt der mediane TFS der ZAP-70 negativen Fälle ($n=62$) 50 Monate. Der mediane TFS der ZAP-70 positiven Fälle ($n=77$) beträgt 24 Monate. Im Diagramm für das OS trat der letzte verzeichnete Todesfall in der ZAP-70 negativen Gruppe nach 76 Monaten in der Nachbeobachtungszeit auf. Die Überlebenswahrscheinlichkeit in dieser Gruppe beträgt damit 85%. In der Gruppe der ZAP-70 positiven Fälle beträgt das mediane OS 100 Monate.

Bei der Betrachtung des Kollektivs im Hinblick auf die Überlebenszeiten unter Berücksichtigung des VH-Mutationsstatus, offenbarte sich bei den Fällen, die eine V3-21 Genbenutzung aufwiesen, eine eigenständige prognostische Relevanz, weshalb diese Fälle als separate, VH-Mutationsstatus unabhängige Risikogruppe betrachtet und die Kohorte in drei einzelne Risikogruppen unterteilt werden konnte.

- (1) Eine Gruppe mit V3-21 Genbenutzung, in die alle Fälle mit einem V3-21 Rearrangement eingereicht wurden, wobei hier der VH-Mutationsstatus unberücksichtigt blieb.
- (2) Eine Gruppe mit unmutierten VH-Status, in die die Fälle mit unmutierten VH-Genen aber ohne V3-21 Rearrangement aufgenommen wurden.
- (3) Eine VH-mutierte Gruppe, in der alle Fälle mit mutiertem VH-Status aber ohne V3-21 Rearrangement zugelassen waren.

Das mediane TFS war in der Gruppe der V3-21 Fälle (n=15) mit 22 Monaten am kürzesten gegenüber der VH-unmutierte Gruppe (n=70) mit 24 Monaten, während in der VH-mutierten Gruppe (n=40) ein therapiefreier medianer Überlebenszeitraum von 172 Monaten festgestellt werden konnte ($p < 0.001$).

Bei Betrachtung des medianen OS stellte sich die Gruppe der V3-21 Fälle (n=15) mit 94 Monaten als prognostisch am ungünstigsten heraus. Die VH-unmutierte Gruppe (n=70) zeigte ein vergleichsweise kurzes medianes OS mit 111 Monaten wohingegen die VH-mutierte Gruppe (n=40) mit dem letzten beobachteten Todesfall nach 15 Monaten in der Nachbeobachtungszeit und damit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 96% die prognostisch günstigste der 3 Risikogruppen darstellte ($p = 0.013$).

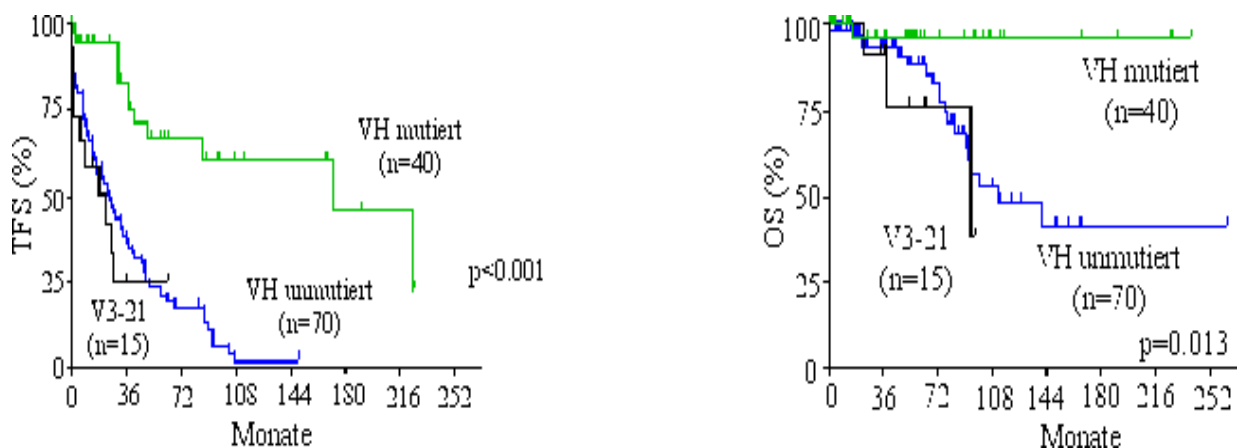


Abbildung 10: Überlebenszeit ohne Therapie (TFS) und Gesamtüberlebenszeit (OS) unter Berücksichtigung des variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus und der V3-21 Genbenutzung. Im Diagramm für den TFS beträgt der mediane TFS für die VH-mutierte Gruppe (n=40) 172 Monate, für die VH-unmutierte Gruppe (n=70) 24 Monate, und für die Gruppe mit V3-21 Genbenutzung (n=16) 22 Monate. Im Diagramm für das OS trat der letzte verzeichnete Todesfall in der VH-mutierten Gruppe nach 15 Monaten in der Nachbeobachtungszeit auf. Die Überlebenswahrscheinlichkeit in dieser Gruppe beträgt 96%. In der VH-unmutierten Gruppe lag der mediane OS bei 111 Monaten und in der Gruppe mit V3-21 Genbenutzung bei 94 Monaten.

Angaben zum Überleben waren in 31 der 33 Fälle mit diskordantem ZAP-70 und VH-Mutationsstatus verfügbar. Unter den 11 diskordanten Fällen ohne zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren erhielten alle 5 Patienten mit einem unmutierten VH-Status eine Therapie. Der einzige beobachtete Todesfall trat bei einem Patienten mit unmutiertem VH-Status auf und auch die Angaben zur Binetstadieneinteilung bei Diagnose zeigten bei zwei dieser Fälle mit Stadium B und C eine prognostisch ungünstige Situation. Damit wiesen alle Fälle einen wie für den individuellen VH-Mutationsstatus und nicht wie für ZAP-70 Expression erwarteten klinischen Verlauf auf.

Tabelle 5: Genetische Charakteristika und klinischer Verlauf bei 11/31 Fälle mit diskordantem zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) und variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus ohne zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren bei denen Angaben zum Überleben vorlagen. Es zeigt sich in allen Fällen ein für den individuellen VH-Mutationsstatus und nicht für die ZAP-70 Expression erwarteter klinischer Verlauf. Unterlegt sind Risikofaktoren bzw. Charakteristika eines ungünstigen klinischen Verlaufs. TFS und OS Angaben in Monaten.

keine zusätzlichen genetischen Hochrisikofaktoren									
ZAP-70 positive Zellen (%)	VH Homologie (%)	V3-21	11q-	17p-	Behandlungsfreies Überleben (TFS) (in Monaten)	Therapie	Gesamtüberleben (OS)(in Monaten)	Todesfälle	Binetstadium bei Diagnose
75	91.23	Nein	Nein	Nein	52	Nein	52	Nein	A
27	92.34	Nein	Nein	Nein	64	Nein	64	Nein	A
30	93.24	Nein	Nein	Nein	10	Nein	10	Nein	A
31	95.95	Nein	nein	Nein	50	Nein	50	Nein	A
35	97.74	Nein	Nein	Nein	25	Nein	25	Nein	A
66	97.93	Nein	Nein	Nein	61	Nein	61	Nein	A
1	98.65	Nein	Nein	Nein	90	Ja	263	Nein	A
9	99.66	Nein	nein	Nein	0	Ja	5	Nein	C
13	100	Nein	Nein	Nein	6	Ja	52	Ja	A
11	100	Nein	Nein	Nein	104	Ja	165	Nein	B
12	100	Nein	Nein	Nein	58	Ja	59	Nein	A

Unter den 20 der 31 diskordanten Fällen mit Angaben zum Überleben bei denen zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren vorlagen, war ein charakteristisches Muster erkennbar.

Die Untergruppe mit V3-21 Genbenutzung zeigte fast ausschließlich eine hohe ZAP-70 Expression bei mutiertem VH-Status und einen aggressiven klinischen Verlauf.

Im Gegensatz dazu zeigte die Untergruppe mit 11q oder 17p Deletion in beinahe allen Fällen eine niedrige ZAP-70 Expression bei unmutiertem VH-Status und einem aggressiven klinischen Verlauf. Alle Patienten mit unmutiertem VH-Status erhielten eine Therapie.

Tabelle 6: Genetische Charakteristika und klinischer Verlauf bei 20/31 Fällen mit diskordantem zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) und variable-heavy gene (VH-) Mutationsstatus mit zusätzlichen genetischen Hochrisikofaktoren bei denen Angaben zum Überleben vorlagen. Die Untergruppe mit V3-21 Genbenutzung lässt eine hohe ZAP-70 Expression trotz eines mutierten VH-Status und einen aggressiven klinischen Verlauf erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt die Untergruppe mit 11q oder 17p Deletion beinahe exklusiv Fälle mit niedriger ZAP-70 Expression trotz eines unmutierten VH-Status und einem aggressiven klinischen Verlauf. Unterlegt sind Risikofaktoren bzw. Charakteristika eines unerwünschten klinischen Verlaufs. TFS und OS Angaben in Monaten.

Zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren									
ZAP-70 positive Zellen (%)	VH Homologie (%)	V3-21	11q-	17p-	Behandlungsfreies Überleben (TFS) (in Monaten)	Therapie	Gesamtüberleben (OS) (in Monaten)	Todesfälle	Binetstadium bei Diagnose
38	96.40	Ja	Ja	Nein	28	Ja	54	Nein	C
27	96.80	Ja	Nein	Nein	36	Nein	36	Nein	A
46	96.85	Ja	Ja	Nein	14	Nein	14	Nein	B
57	96.94	Ja	Ja	Nein	8	Ja	39	Ja	A
78	97.30	Ja	Nein	Nein	22	Ja	64	Nein	A
60	97.58	Ja	Nein	Nein	1	Ja	94	Ja	B
38	97.62	Ja	Nein	Nein	36	Nein	36	Nein	B
30	94.14	Nein	Nein	Ja	0	Ja	15	Ja	B
11	98.20	Ja	Nein	Nein	17	Ja	38	Nein	B
10	98.64	Nein	Ja	Nein	13	Ja	113	Nein	B
12	100	Nein	Ja	Nein	27	Ja	88	Nein	k.A.
1	100	Nein	Ja	Nein	87	Ja	89	Nein	A
15	100	Nein	Ja	Nein	48	Ja	53	Nein	A
5	100	Nein	Ja	Nein	92	Ja	151	Nein	A
1	100	Nein	Ja	Nein	7	Ja	86	Nein	k.A
9	100	Nein	Ja	Nein	62	Ja	62	Nein	C
11	99.55	Nein	Nein	Ja	29	Ja	76	Ja	A
15	99.66	Nein	Nein	Ja	0	Ja	69	Ja	k.A.
10	100	Nein	Nein	Ja	37	Ja	54	Nein	A
16	100	nein	Nein	Ja	1	Ja	21	Ja	B

3.3 Prognostische Bedeutung von ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus, V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Aberrationen in multivariaten Analysen.

Die ZAP-70 Expression, der VH-Mutationsstatus, das Auftreten von V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Aberrationen (11q und 17p Deletionen) wurden hinsichtlich ihres unabhängigen prognostischen Wertes unter Verwendung des Proportional Hazard Regression Model nach Cox (Cox 1972) analysiert. Hierbei ergab sich, dass unter Einschluss aller Parameter in das Modell, die Merkmale unmutierter VH-Status, V3-21 Genbenutzung und die Hochrisiko-Aberrationen 11q und 17p Deletion als unabhängige Parameter zur Vorhersage des TFS herangezogen werden konnten, nicht jedoch die ZAP-70 Expression.

Unter Testung eines weiteren Modells konnte gezeigt werden, dass unter Ausschluss des VH-Mutationsstatus und der V3-21 Genbenutzung, die ZAP-70 Expression als unabhängiger Parameter neben den Hochrisikomerkmalen 11q und 17p Deletionen zur Vorhersage dienen kann. Für das OS wurden aufgrund der wenigen Todesfälle innerhalb der einzelnen Risikogruppen in der Nachbeobachtungszeit keine multivariaten Analysen durchgeführt.

Tabelle 7: Multivariate Regressionsanalyse des die zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) Status, variable-heavy gene (VH-) Status und genomischer Aberrationen im Hinblick auf behandlungsfreies Überleben bei CLL.

A) ZAP-70 wurde nicht als ein signifikanter prognostischer Parameter selektiert, wenn der VH-Mutationsstatus in die multivariate Analyse eingeschlossen wurde.

B) ZAP-70 wurde als signifikanter prognostischer Parameter selektiert, wenn der VH-Mutationsstatus nicht in der multivariaten Analyse eingeschlossen wurde.

Parameter	hazard ratio	95% KI	P-Wert	hazard ratio	95% KI	P-Wert
VH-unmutiert	2.9	1.6 - 5.6	<0.001	-	-	-
V3-21	2.6	1.1 - 6.3	0.035	-	-	-
Hochrisiko-Genom-aberrationen	1.7	1.1 - 2.8	0.027	2.2	1.4 - 3.4	<0.001
ZAP-70 positiv	1.2	0.7 - 2.0	0.48 (A)	1.9	1.2 - 3.9	0.006 (B)

Basierend auf den Ergebnissen der Cox Regressionsanalysen wurden zwei prognostische Modelle entwickelt. Das erste Modell bestand aus fünf genetischen Untergruppen, in denen jeder Patient nur einer Kategorie zugeordnet wurde.

- (1) eine 17p Deletion und keine V3-21 Genbenutzung,
- (2) eine 11q Deletion jedoch keine 17p Deletion und keine V3-21 Genbenutzung,
- (3) V3-21 Genbenutzung,
- (4) Fälle die VH-unmutiert waren und keine zusätzlichen genetischen Hochrisikofaktoren aufwiesen,
- (5) eine Kategorie, in die VH- mutierte Fälle ohne zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren aufgenommen waren.

Das mediane TFS für diese Kategorien war 15 Monate für 17p Deletionen, 20 Monate für 11q Deletionen, 22 Monate für V3-21 Genbenutzung, 31 Monate für die VH-unmutierte Gruppe und 172 Monate für die VH- mutierte Gruppe. Die in den zwei Modellen dargelegte prognostische Aussagekraft der Kategorien wurde bei der OS-Analyse wiedergefunden.

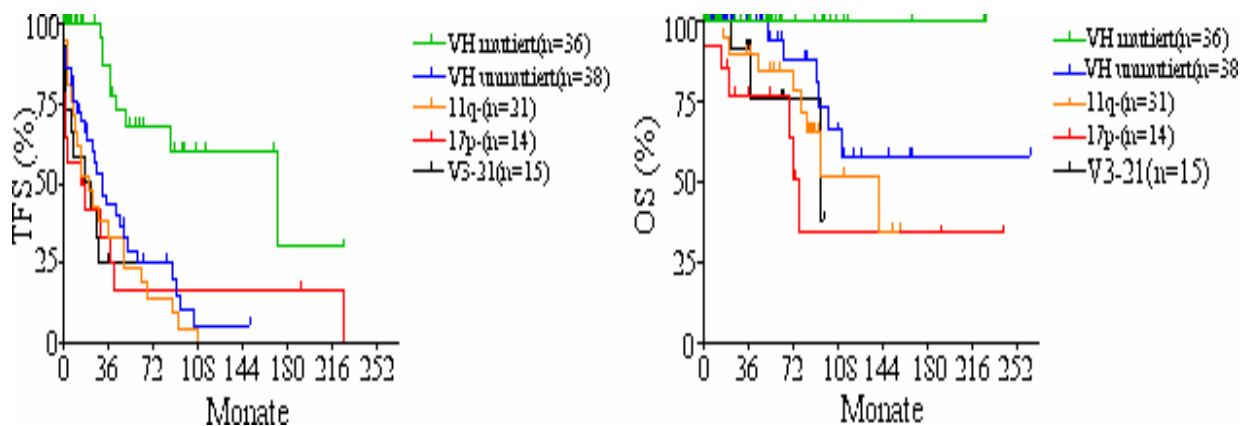


Abbildung 11: Abgebildet sind Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit ohne Therapie (TFS) und die Gesamtüberlebenszeit (OS) basierend auf multivariaten Regressionsanalysen.

Links: Zu sehen sind die Kategorien variable-heavy gene (VH-) mutiert, VH-unmutiert, V3-21 Genbenutzung, 11q Deletion und 17p Deletion mit 172, 31, 22, 20 und 15 Monaten TFS.

Rechts: Gleiche Gruppen im Hinblick auf OS. Keine Todesfälle in der VH-mutierten Gruppe. Der letzte verzeichnete Todesfall in der VH-unmutierten Gruppe trat nach 111 Monaten der Nachbeobachtungszeit (Überlebenswahrscheinlichkeit 58%) auf. Das mediane OS in den Gruppen mit V3-21 Genbenutzung, 11q Deletion und 17p Deletion war 94, 141 und 76 Monate.

Im zweiten Modell wurden der VH-Mutationsstatus und die V3-21 Genbenutzung durch die ZAP-70 Expression ersetzt. Die folgenden vier Kategorien, in denen jeder Patient jeweils nur einer zugeordnet worden war, waren wie folgend definiert:

- (1) eine 17p Deletion ohne Berücksichtigung der ZAP 70 Expression,
- (2) eine 11q Deletion ohne Berücksichtigung der ZAP-70 Expression,
- (3) Fälle, die ZAP-70 positiv waren aber keine Hochrisiko-Aberrationen zeigten,
- (4) ZAP-70 negative Fälle, die jedoch keine Hochrisiko-Aberrationen aufwiesen.

Das mediane TFS für diese Kategorien war 15 Monate für 17p Deletionen, 20 Monate für 11q Deletionen, 31 Monate für die ZAP-70 positive Gruppe und 86 Monate für die ZAP-70 negative Gruppe.

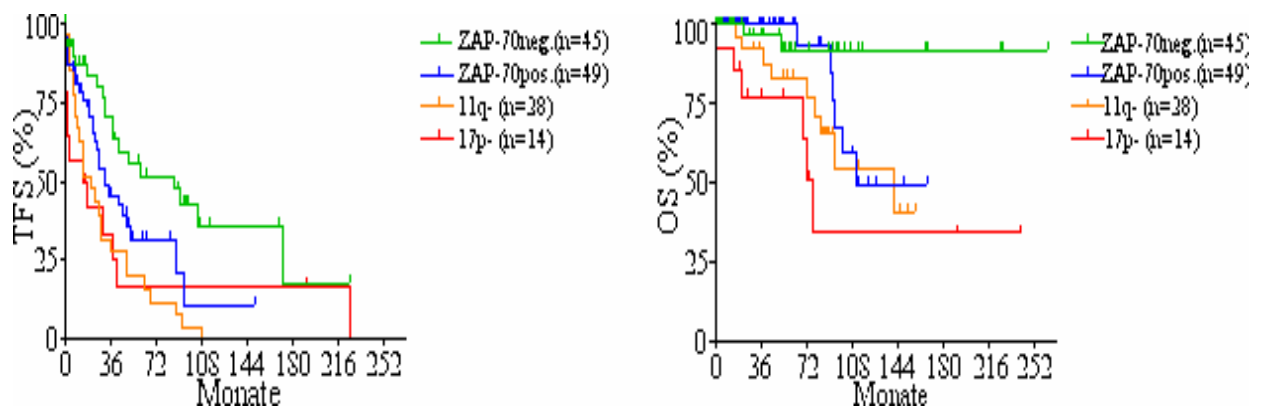


Abbildung 12: Abgebildet sind Kaplan-Meier Kurven der Überlebenszeit ohne Therapie (TFS) und die Gesamtüberlebenszeit (OS) basierend auf multivariaten Regressionsanalysen.

Links: Gezeigt ist das mediane TFS für die Kategorien zeta-associated protein of 70 kilo Dalton (ZAP-70) negativ, ZAP-70 positiv, 11q Deletion und 17p Deletion mit 86, 31, 20 und 15 Monaten.

Rechts: Gleiche Gruppen im Hinblick auf OS. Letzter beobachteter Todesfall in der ZAP-70 negativen Gruppe nach 52 Monaten (Überlebenswahrscheinlichkeit 92%). Das mediane OS in den Gruppen ZAP-70 positiv, 11q Deletion und 17p Deletion war 111, 141 und 76 Monate.

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

In der vorliegenden Dissertation wurde ein CLL Patientenkollektiv mit 148 Patienten auf den Zusammenhang und die prognostische Aussagekraft der ZAP-70 Expression, des VH-Mutationsstatus und zusätzlicher genetischer Hochrisikofaktoren, wie V3-21 Genbenutzung und genomischen Aberrationen hin untersucht. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien konnte eine starke Assoziation der ZAP-70 Expression von >20% und unmutierten VH-Genen bei schlechter Prognose bzw. einer ZAP-70 Expression von <20% und mutierten VH-Genen bei guter Prognose bestätigt werden (*Crespo et al. 2003; Orchard et al. 2004; Rassenti et al. 2004; Rosenwald et al. 2001; Wiestner et al. 2003*).

In 25% der analysierten Fälle zeigte sich jedoch eine Diskordanz der ZAP-70 Expression und des VH-Mutationsstatus. In vorangegangenen Studien schwankte der Anteil diskordanter Fälle zwischen 5% und 23% (*Crespo M et al. 2003; Orchard et al. 2004; Rassenti et al. 2004*).

Die Immunphänotypisierung mit anschließender Quantifizierung des ZAP-70 Proteins durch die FACS-Analyse scheint als Ursache für diese Abweichungen nicht in Betracht zu kommen, da diese Methode in verschiedenen Studien durch zusätzliche Ansätze wie Western Blot, DNA-Microarrays und quantitative RT-PCR, die sich durch eine außerordentlich hohe Messgenauigkeit auszeichnet, erfolgreich validiert worden war. Der Vorteil der Immunphänotypisierung gegenüber den anderen Verfahren ist die mögliche Unterteilung der betrachteten Proben anhand der Leukozytenantigene (nach der CD-Klassifikation) in Subpopulationen und die quantitative Messung der ZAP-70 Expression in den einzelnen Zellverbänden, wodurch die ansonsten nötige Abtrennung der ebenfalls ZAP-70 exprimierenden T- und NK-Zellen entfällt (*Wiestner et al. 2002; Crespo et al. 2003; Rassenti et al. 2004*).

Eine mögliche Erklärung für die Diskordanzen könnte jedoch in den unterschiedlichen durchflusszytometrischen Messmethoden, die in den einzelnen Studien zur Anwendung kamen, zu finden sein. Es ist denkbar, dass die Verwendung unterschiedlicher Antikörperklone mit divergierender Antigenaffinität oder der Einsatz von direkten (mittels Primär-) bzw. indirekten Färbemethoden (mit Sekundärantikörpern) zu diesen Unterschieden

beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sekundärantikörperklon verwendet, der zu diesem Zeitpunkt gegenüber anderen zur direkten Färbung eingesetzten Klonen in verschiedenen Ansätzen überlegen war (*Le Garff-Tavenier et al. 2004*). Es bleibt zu prüfen, welche der zurzeit neu entwickelten Klone in Kombination mit den gegenwärtig angewendeten Gating-Strategien die höchste Zuverlässigkeit für die Quantifizierung von ZAP-70 bieten, um einen internationalen methodischen Konsens zum ZAP-70 Nachweis zu erreichen. Hierzu wurde ein internationales Konsortium zur technischen Standardisierung etabliert (*Le Garff-Tavenier et al. 2004*). Weiterhin muss überprüft werden, ob sich die Expressionsstärke von ZAP-70 in frischen Blutproben anders als in kryokonservierten Proben verhält bzw. sich über die Zeit verändert. Nach manchen Autoren soll der Grad der Expression konstant bleiben (*Rassenti et al. 2004*).

Bei näherer Betrachtung aufgetauter Patientenproben in dieser Arbeit zeigte sich durch eine separate 7-AAD Apoptosefärbung, dass eine zuvor durchgeführte Ficoll Dichtegradientenzentrifugation zu einem niedrigeren Anteil an avitalen Zellen führte und die jeweiligen Zellverbände in der Dot-plot Darstellung distinktere Populationen bildeten. Hierdurch konnte in der Auswertung ein deutlich höheres Maß an Spezifität und Reliabilität erreicht und der systematische Fehler somit verringert werden.

4.2 Inhaltliche Aspekte

Art der gefundenen Diskordanzen

Vor dem Hintergrund der diskutierten methodischen Aspekte lassen die vorliegenden Daten als Hauptursache für die Diskordanzen in dieser Arbeit auf alternative biologische Mechanismen schließen, da die Assoziation zwischen ZAP-70 Expression und dem VH-Mutationsstatus signifikant variierte, je nachdem ob zusätzliche genetische Hochrisikofaktoren vorhanden waren oder fehlten.

Die gefundenen Diskordanzen zeigten ein charakteristisches Muster, bei dem der Anteil diskordanter Fälle in der Untergruppe mit vorhandener V3-21 Genbenutzung, und 17p oder 11q Deletionen mit insgesamt 39% besonders hoch war.

Interessanterweise zeigte die Art der Diskordanzen mit den Kombinationen ZAP-70 positiv/VH-mutiert oder ZAP-70 negativ/VH-unmutiert innerhalb der Gruppe mit genetischen Hochrisikomerkmale erstaunliche Unterschiede. Fälle mit V3-21 Genbenutzung waren fast ausschließlich (89% der Fälle) ZAP-70 positiv und VH-mutiert, wohingegen alle bis auf einen der diskordanten Fälle bei vorhandenen Hochrisiko-Aberrationen (92% der Fälle) ZAP-70 negativ und VH-unmutiert waren. Im Gegensatz dazu war die Assoziation von ZAP-70 Expression und dem VH-Mutationsstatus stärker in Fällen ohne V3-21 Genbenutzung, 17p Deletionen oder 11q Deletionen und zeigte hier 84% Übereinstimmung bei annähernd ausgeglichenem Verhältnis der diskordanten Gruppierungen zueinander mit einem Anteil der ZAP-70 positiven/VH-mutierten Fälle mit 55% gegenüber einem Anteil von 45% der ZAP-70 negativen /VH-unmutierte Fälle.

Die ermittelten Daten legen den Schluss nahe, dass die Mehrzahl der ZAP-70- und VH-Status diskordanten Fälle durch die hohe Rate der Diskrepanzen bei Fällen mit vorhandenen zusätzlichen genetischen Hochrisikomerkmale erklärt werden könnten. Die Zusammensetzung der Patientenkohorten bereits publizierter Studien unterstreicht diese Vermutung. In Studien bei denen jeweils starke Übereinstimmungen (95% bei Crespo und 92% bei Orchard) des ZAP-70- und VH-Status gefunden worden waren, setzten sich die Kollektive zu großen Anteilen aus Patienten zusammen, die sich im Stadium A nach Binet befanden (79% und 86%) (*Crespo et al. 2003 und Orchard et al. 2004*).

Zusätzlich waren in der Studie von Orchard (*Orchard et al. 2004*) 68% der Fälle VH-mutiert und die Inzidenzen der Hochrisiko-Genomaberrationen waren mit 17p Deletionen in 4% der

Fälle und 11q Deletionen bei 8% der analysierten Patienten gering. Im Gegensatz dazu untersuchte Rassenti (*Rassenti et al. 2004*) ein Kollektiv in dem die Patienten zu 53% VH-unmutiert waren und weitgehend eine bereits fortgeschrittene Krankheit zeigten. Diese Patienten waren bei Aufnahme in die Studie in bereits ca. 50% der Fälle behandelt worden. Bezeichnenderweise fand sich hier ein deutlich niedrigerer Grad an Übereinstimmungen des ZAP-70- und VH-Status mit lediglich 77% Konkordanz.

Stellenwert der gewonnenen Daten vor dem Hintergrund der Theorie zur Pathogenese der CLL

Die in der vorliegenden Dissertation gewonnenen Daten stützen das von Chiorazzi vorgeschlagene Modell zur Pathogenese der CLL, bei dem der reguläre B-Lymphozyt durch Stimuli aus der Umgebung zur Proliferation angeregt wird und durch weitere genetische Läsion ein rasanteres Wachstum gegenüber anderen B-Lymphozyten aufweisen kann (*Chiorazzi et al. 2005*).

Als Stimuli werden Antigene latenter Viren oder kommensaler Bakterien, ähnlich dem MALT-Lymphom bei vorhandenem *Helicobacter Pylori*, bzw. Autoantigene diskutiert, die durch Interaktion mit dem B-Zellrezeptor die Zelle aktivieren, insbesondere wenn die VH-Gene unmutiert sind. Auch sollen Cytokine, Chemokine oder direkte Zellinteraktionen als mögliche Stimuli in Frage kommen. So angeregte Klone, die eine höhere Zellteilungsrate aufweisen, sind prädisponiert für andere genetische Veränderungen die den Verlauf der Krankheit massiv beeinflussen können, wie z.B. die Chromosomendeletionen 17p oder 11q, die häufiger bei Patienten mit unmutierten VH-Genen auftreten (*Chiorazzi et al. 2005; Kröber et al. 2002*).

Ein Überlebensvorteil der CLL-Zellen als Folge der B-Zellrezeptor abhängigen Interaktion mit unbekanntem Antigenen könnte die Hinweise auf einen Selektionsdruck durch Antigene erklären: So z.B. die begrenzte VH-Genbenutzung, besonders bei der VH-unmutierten Untergruppe, limitierte VHDJH-Kombinationen (Immunglobulin heavy chain variable (VH), diversity (DH) und joining (JH) Gensegmente) (*Fais et al. 1998; Kröber et al. 2002b; Potter et al. 2003*) und dem Auftreten hochgradig homologer V-Gene, die B-Zellrezeptoren mit beinahe identischen CDR3 (complementary determinig 3 regions) Regionen einschließen, (*Tobin et al. 2002; Tobin et al. 2003; Ghiotto et al. 2004; Messmer et al. 2004*) eine konservierte V3-21 Struktur, gekennzeichnet durch eine bemerkenswert enge Mutationsbreite

hauptsächlich zwischen 2% und 4% wie anhand der Grafik für die V3-21 Genbenutzung in Abbildung 8 erneut gezeigt werden konnte, eine begrenzte JH6-Genbenutzung und ein limitiertes Auftreten der V- λ 2-14-Leichtketten-Gene in V3-21 Rearrangements (*Tobin et al. 2002; Tobin et al. 2003*).

Die Gruppe um Chen hatte bei in-vitro-Versuchen zeigen können, dass eine Stimulation des B-Zellrezeptors besonders bei unmutierten VH-Genen zu Phosphorylierung von ZAP-70 und anderen zytoplasmatischen, proliferationsassoziierten Proteinen führte, was für eine Beteiligung von ZAP-70 an der BCR Signaltransduktion spricht (*Chen et al. 2002; Chen et al. 2005*). ZAP-70 war in der vorliegenden Arbeit bei den meisten der VH-unmutierten Fälle und interessanterweise in der Mehrzahl der Fälle mit mutiertem V3-21 Gen hochreguliert. Jedoch konnte ein hoher Grad an ZAP-70 Negativität in VH-unmutierten Fällen mit Hochrisiko-Aberrationen beobachtet werden.

Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass 17p oder 11q Deletionen, die kritische Onkogene wie TP53, ATM und möglicherweise andere Gene in 11q22-q23 betreffen, in eine Situation mit Überlebensvorteil für die entarteten B-Zellen führen in der durch ZAP-70 vermittelte Effekte für die Proliferation und Umgehung der Apoptose nicht weiter notwendig sind.

Prognostische Bedeutung von ZAP-70 Expression, VH-Mutationsstatus, V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Aberrationen in multivariaten Analysen

Zur Beurteilung der prognostischen Bedeutung der Hochrisikomerkmale, wie der V3-21 Genbenutzung, der 11q oder 17p Deletion, wurde eine multivariate Regressionsanalyse durchgeführt bei der das Auftreten einer V3-21 Genbenutzung, der VH-Mutationsstatus und das vorhandene Hochrisiko-Genomaberrationen, aber nicht die ZAP-70 Expression als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert wurden.

Anhand der multivariaten Regressionsanalyse wurde ein Modell entworfen, das den VH-Mutationsstatus, das Auftreten V3-21 Genbenutzung, die 17p und 11q Deletionen beinhaltet. Die Unterteilung in diese prognostischen Kategorien erlaubte eine gute Vorhersage des klinischen Verlaufs bei der CLL. Jedoch war der Zusammenhang von ZAP-70 und dem VH-Mutationsstatus sehr hoch bei Fällen ohne zusätzliche genetische Hochrisikomerkmale und die Mehrzahl der V3-21 Fälle zeigte starke ZAP-70 Expressionen unabhängig vom VH-Mutationsstatus. Anhand dieser Beobachtungen wurde ein zweites Modell getestet, welches die ZAP-70 Expression und die Hochrisiko-Aberrationen beinhaltet. Die Vorhersage des

klinischen Verlaufs war dem vorangegangenen Modell, das den VH-Mutationsstatus, V3-21 Genbenutzung und Hochrisiko-Genomaberrationen beinhaltet sehr ähnlich. Deshalb könnte ein prognostisches Modell basierend auf ZAP-70 Expression und Hochrisiko-Genomaberrationen eine Alternative für die Risikostratifikation der CLL Patienten sein, falls VH-Genanalysen nicht verfügbar sind.

Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal charakteristische Muster wichtiger prognostischer Merkmale wie 11q Deletion, 17p Deletion und V3-21 Genbenutzung bei B-CLL Fällen mit diskordanter ZAP-70 Expression und VH-Mutationsstatus. Die ZAP-70 Expression konnte einen ungünstigen klinischen Verlauf in Fällen, die eine V3-21 Genbenutzung zeigten, ohne Berücksichtigung des VH-Mutationsstatus voraussagen, aber nicht den ungünstigen klinischen Verlauf bei Fällen mit unmutiertem VH-Status und 11q oder 17p Deletion. Angesichts der Daten die hier vorgelegt werden erscheint es schlüssig, dass Hochrisiko-Aberrationen als wichtige unabhängige Faktoren zusätzlich zum VH-Mutationsstatus und der ZAP-70 Expression für die Risikostratifikation bei der B-CLL betrachtet werden können.

Wenn Hochrisiko-Aberrationen vorliegen, ist es wichtig diese zusätzlich zum VH-Status und des ZAP-70 Status für die Vorhersage des klinischen Verlaufs zu berücksichtigen. Bei fehlenden Hochrisiko-Aberrationen haben der VH-Mutationsstatus und die ZAP-70 Expression vermutlich ähnliche prognostische Wertigkeit und könnten deshalb alternativ verwendet werden. Dies zeigt sich durch die Tatsache, dass Hochrisiko-Aberrationen wie 11q und 17p Deletionen in der multivariaten Analysen als signifikante unabhängige Faktoren für beide prognostischen Modelle, basierend auf dem ZAP-70- oder VH-Status identifiziert werden konnten.

Diese Beobachtungen lassen biologische Schlussfolgerungen im Hinblick auf die Existenz verschiedener, B-Zellrezeptor abhängiger und unabhängiger Pathomechanismen in genetischen Subgruppen der CLL zu und zeigen zusätzlich auch diagnostische Wertigkeit in Hinblick auf die Verwendung von ZAP-70 als Indikator für Prognose und den Verlauf. Die gewonnenen Daten zeigen die komplexe Situation bei der Beurteilung der prognostischen Wertigkeit und dem Zusammenspiel vieler Faktoren die sich bei der CLL finden. Deshalb ist es erforderlich weitere Kombinationen der prognostischen Faktoren in prospektiven

Untersuchungen zu beleuchten und weitere grundlegende Zusammenhänge der pathogenetischen Prozesse bei der CLL zu analysieren.

5. Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) ist die häufigste Leukämie von Erwachsenen in Westeuropa und Nordamerika. Der klinische Krankheitsverlauf zeigt von Patient zu Patient eine große Schwankungsbreite, wobei die Überlebenszeiten zwischen wenigen Monaten und mehreren Jahrzehnten betragen können. Im Rahmen der Bemühungen um Prognosefaktoren, die detailliertere individuelle Vorhersagen ermöglichen, wurde das Auftreten des unmutierten Anteils der variablen Immunglobulin Schwerkettengene (VH-Gene von engl.: „variable-heavy“) mit Expression des zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70) und schlechter Prognose in Zusammenhang gebracht. ZAP-70 ist eine Tyrosinkinase aus der Gruppe der Syk-Kinasen, die physiologischerweise dem Cluster of Differentiation (CD)3-Rezeptor der T-Zellen assoziiert ist und eine zentrale Stellung in der Signaltransduktion einnimmt.

Auch bei der B-CLL konnte für ZAP-70 eine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden. Die Stimulierung des B-Zellrezeptors (BCR) über membranständiges Immunglobulin (Ig) M führte bei VH-unmutierten CLL-Fällen mit ZAP-70 Expression zur Phosphorylierung von ZAP-70 und zytoplasmatischen proliferationsassoziierten Proteinen, während in VH-mutierten CLL-Fällen in der Mehrzahl keine Signaltransduktion über IgM ausgelöst werden konnte. In der vorliegenden Dissertation wurde mittels Immunphänotypisierung und fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) die Expressionsstärke von ZAP-70 hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft an einem Kollektiv von 148 Patienten, durch Korrelation mit Daten für den VH-Mutationsstatus, zusätzlichen unabhängigen genetischen Hochrisikofaktoren wie 11q und 17p Deletionen und dem Auftreten von V3-21 Gensequenzen bei CLL evaluiert.

Hierbei ergab sich eine starke Assoziation von ZAP-70 Expression und VH-Mutationsstatus bei Fällen ohne zusätzliche genetische Hochrisikomerkmale wie 11q oder 17p Deletionen und V3-21 Sequenzen (84% Übereinstimmung).

Im Gegensatz dazu war der Anteil der diskordanten Fälle signifikant höher (39%), wenn solche zusätzlichen genetischen Hochrisikomerkmale vorhanden waren. Diese Diskordanzen könnten zum Teil mit unterschiedlichen durchflusszytometrischen Messmethoden der einzelnen Studiengruppen zusammenhängen, wobei die gegenwärtige Datenlage als Ursache für die Diskordanzen eher auf alternative biologische Mechanismen schließen lässt. Diskordante Fälle mit V3-21 Benutzung waren fast ausschließlich ZAP-70 positiv und VH-

mutiert, wohingegen alle bis auf einen der diskordanten Fälle mit Hochrisiko-Aberrationen ZAP-70 negativ und VH-unmutiert waren.

Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung der Hochrisikomerkmale konnte anhand einer durchgeführten multivariaten Regressionsanalyse ein Modell entworfen werden, das den VH-Mutationsstatus, das Auftreten V3-21 Genbenutzung, die 17p und 11q Deletionen beinhaltet und durch die Unterteilung in diese prognostischen Kategorien eine gute Vorhersage des klinischen Verlaufs bei der CLL erlaubte.

Die unterschiedlichen diskordanten Muster bei den V3-21 und 11q oder 17p Untergruppen zeigen biologische und klinische Relevanz im Hinblick auf B-Zellrezeptor abhängige und unabhängige Pathomechanismen und stützen ein kürzlich vorgeschlagenes Modell zur Pathogenese der CLL, bei dem der reguläre B-Lymphozyt durch Stimuli aus der Umgebung zur Proliferation angeregt wird und durch zusätzliche genetische Läsionen ein acceleriertes Wachstum gegenüber anderen B-Lymphozyten aufweisen kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal charakteristische Muster wichtiger prognostischer Merkmale und legen den Schluss nahe, dass Hochrisiko-Aberrationen als wichtige unabhängige Faktoren zusätzlich zum VH-Mutationsstatus und der ZAP-70 Expression für die Risikostratifikation bei der B-CLL betrachtet werden können.

Hochrisiko-Aberrationen dienen zusätzlich zum VH-Status und dem ZAP-70 Status als prognostischer Indikator, wobei bei fehlenden Hochrisiko-Aberrationen der VH-Mutationsstatus und die ZAP-70 Expression vermutlich ähnliche prognostische Wertigkeit besitzen und deshalb alternativ verwendet werden können.

6. Literaturverzeichnis

Bolen JB, Brugge JS: Annual Review of Immunology 15: 371-404. (1997)

Benschop RJ, Cambier JC: B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. Curr Opin Immunol 11: 143-151. (1999)

Berek C, Ziegner M: The maturation of the immune response. Immunol Today 14: 400-404. (1993)

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)

Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW: Chronic lymphocytic leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program):163-183. (2004)

Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. Cell 71:649-662. (1992)

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)

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)

Chiorazzi N, Rai KR, and Ferrarini M: Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 352:804-815. (2005)

Cook GP, Tomlinson IM: The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 16: 237-242. (1995)

Coupland SE, Hummel M, Stein H: Lymphatic system and differentiation of B- and T-lymphocytes. *Pathologie* 21:106-112. (2000)

Cox DR: Regression models and life-tables. *J R Stat Soc.* 34:187-220. (1972)

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez 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)

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)

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-47. (1999)

Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL and Tavade P for the French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia: Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 21:1506-14. (1998)

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)

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)

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)

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)

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-16. (2000)

Dürig J, Nuckel H, Cremer M, Fuhrer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Moroy T, Klein-Hitpass, L, Dührsen U: ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 17:2426-2434. (2003)

Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, Parslow TG: Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science*. 264:1596-1599. (1994)

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)

Faguet GB: Chronic lymphocytic leukemia: an updated review. *J Clin Oncol* 12: 1974-1990. (1994)

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 Jr. HW, 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)

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)

Gale RP, Foon KA: Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology* 24:209-229. (1987)

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)

Grawunder U, West RB, Lieber MR: Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 10:172-180. (1998)

Haidar MA, Kantarjian H, Manshouri T, Chang CY, O'Brien S, Freireich E, Keating M, Albitar M : ATM gene deletion in patients with adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1;88:1057-1062. (2000)

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, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93:1732-37. (1999)

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* 94:1848-54. (1999)

Harrell FE: Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis. Springer, New York. (2001)

Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H: Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH-Genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood* 84:403-407. (1994)

Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC and Weiss A: Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 263:1136-1139. (1994)

Jacobs H, Bross L: Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 13:208-218. (2001)

Juliusson G, Oscier D, Gahrton G, for the International Working Party on Chromosomes in CLL (IWCCLL): Cytogenetic findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients. *Leuk Lymphoma* 5:21-25. (1991)

Kallander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS: Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 54:2450-55. (1984)

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

Korn EL: Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Statistics in Medicine* 5:255-260. (1986)

Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-16. (2002)

Kröber A, Benner A, Bühler A, Döhner H, Stilgenbauer S: Multivariate survival analysis of specific VH-genes in CLL: V3-21 and V3-23 are prognostic factors independently of the VH mutation status. *Blood* 100 suppl. 1:738a. (Abstr.). (2002b)

Küppers R, Klein U; Hansmann MI, Rajewsky K: Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341:1520-29. (1999)

Lanham S, Hamblin TJ, 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)

Le Garff-Tavenier M, Ticchioni M, Letestu R, Brissard M, Davi F, Semichon M, Vuillier F, Cymbalista F, Merle-Beral H: Is ZAP-70 Protein Detection by Flow Cytometry a Reliable Tool in CLL Prognostic Evaluation?. *Blood (ASH-Annual Meeting Abstracts)* 104: Abst. 4771. (2004)

Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and Ig VH mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100: 1404-9 (2002). (Erratum *blood* 2002 100:2291).

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)

Meinhardt G, Wendtner CM, Hallek M: Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: factors and signaling pathways regulating cell growth and survival. *J Mol Med* 77: 282-293. (1999)

Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, Foa R, Damle RN, Fais F, Messmer D, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N: Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 200:519-525. (2004)

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)

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)

Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG: ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 363:105-111. (2004)

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)

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)

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribbon 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 Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 351:893-901. (2004)

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

Rai KR, Han T: Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 4:447-456. (1990)

Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA: Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1750-1757. (2000)

R Development Core Team. 2004. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383-384. (1989)

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)

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis ER, 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 L: Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 194:1639-1647. (2001)

Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F, Alcala A, Gutierrez M, Maldonado J, Gonzales C, Giralt M, Hernandez-Nieto L, Cabrera A, Fernandez-Ranada JM: 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)

Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1333:1052-1057. (1995)

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)

Schroeder HW, Jr., Dighiero G: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 15:288-294. (1994)

Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J: Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 19:750-758. (2005)

Schwartz RS: Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. *N Engl J Med* 333:42-44. (1995)

Sekiguchi J, Frank K: V(D)J recombination. *Curr Biol* 9:R835. (1999)

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)

Stevenson FK, Caligaris-Cappio F: Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103:4389-4395. (2004)

Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Döhner H: Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nature medicine* 3:1155-59. (1997)

Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, Wolf S, Weitz S, Döhner K, Boehm T, Döhner H, Lichter P: Expressed Sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 16:891-1897. (1998)

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

Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström C, Roos G, Rosenquist R: Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99:2262-2264. (2002)

Tobin G, Thundberg 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)

Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S, Yamamura H: Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis.

J Biol Chem 266:15790-15796. (1991)

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis ER, 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)

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 Abteilung durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Stephan Stilgenbauer für die Überlassung des Themas und die exzellente Führung durch die Thematik.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Alexander Kröber bedanken für die ausgesprochen gute Betreuung und die geduldige Einführung in die medizinische Forschung.

Christine Schöpflin, Anke Schmid, Renate Kaiser und Anna DiNisioMarra danke ich in ganz besonderem Maße dafür, dass sie mir mit ihrem unschätzbaren Fundus an labortechnischem Wissen jederzeit zur Seite standen und es durch ihre freundliche und persönliche Art stets Spaß machte die vielen Nachmittage und Abende im Labor zu verbringen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 30. Oktober 1980 in Stuttgart - Bad Cannstatt.

Akademische Ausbildung

- Seit 2001 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm.
Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung am 27.08.2003 mit der Note 1.6.
- 2003 Famulatur in der Abteilung für Hämatologie am Concord Repatriation Hospital, Central Clinical School der University of Sydney, Australien.
- 2004 Seit Oktober Doktorand in der Abteilung Innere Medizin III der Universität Ulm.
Famulatur in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektionskrankheiten, Innere Medizin III der Universität Ulm.
- 2005 Famulatur in der Abteilung für Allgemeinchirurgie des Newham General Hospital, Clinical School, University of London, Great Britain.
Famulatur in der HNO-Klinik der Universität Ulm.
Famulatur in der Abteilung für rekonstruktive Gesichtschirurgie, Prof. Dr. med. W. Gubisch, Marienhospital Stuttgart.
- 2006/
2007 Praktisches Jahr:
Wahlfach: Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Prof. Dr. med. H-J. Brambs, Universitätsklinikum Ulm.
Chirurgie: Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. med. T. Carrel, Inselspital, Universitätsklinikum Bern, Schweiz.
Innere Medizin: MD Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, USA.

Schulbildung und Zivildienst

- 1987-1991 Besuch der Hainbach Grundschule, Esslingen.
1991-2000 Besuch des Schelztor Gymnasiums, Esslingen.
2000 Allgemeine Hochschulreife.
2000-2001 Zivildienst im Zentral-OP der Abteilungen für Allgemein-, Gefäß-, Unfallchirurgie, Orthopädie und Gynäkologie, Städtische Kliniken Esslingen.