

**Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Assoziation von Genpolymorphismen der 5'flankierenden Region des
Interleukin-10-Gens auf das Überleben oder die Remissionsrate beim
aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom**

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

Thanh Duc HUA

aus

Hanau

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichtstatter: PD. Dr. rer. nat. D. Kube

II. Berichtstatter / in: _____

III. Berichtstatter / in: _____

Tag der mündlichen Prüfung:

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
bp	"base pair(s)"
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisolon
ConA	Concanavalin A
CR	"complete remission"
DLBCL	Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
ECOG	"Eastern Cooperative Oncology Group"
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EFS	"event free survival"
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FDR	"false discovery rate"
g	Gramm
G	Guanin
G-CSF	"Granulocyte-Colony-Stimulating Factor"
GM-CSF	"Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor"
Gy	Gray
h	Stunde
HEX	Hexachlorfluorescein
Ig	Immunglobulin

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPI	internationaler prognostischer Index
kb	"kilobase(s)"
KCl	Kaliumchlorid
kv	Kilovolt
l	Liter
M	"molar"
max.	maximal
med.	medicinae
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mod.	modifiziert
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom(e)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OS	"overall survival"
PCR	"polymerase chain reaction"
pg	Pikogramm
PKA	Proteinkinase A
POP4	"Processing of precursor 4"
Prof.	Professor
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin

rpm	"rounds per minute"
rs	"reference SNP"
S.	Seite
SAS	"Statistical Analysis System"
sek.	Sekunde
SNP	"single nucleotide polymorphism(s)"
STR	"short tandem repeat"
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TaqMan®-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
TNF®	Tumornekrosefaktor ®
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VIC	Fluoreszenzfarbstoff, chemische Struktur nicht veröffentlicht
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	10
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Ätiologie	10
1.1.2	Das klinische Bild des NHL	11
1.1.3	Die Klassifikation des NHL	12
1.1.4	Therapiemöglichkeiten des aggressiven NHL	15
1.2	Das Non-Hodgkin-Lymphom – Eine Erkrankung des Immunsystems	15
1.3	Genvariationen	16
1.4	Interleukin-10 (IL-10)	18
1.4.1	Interleukin-10 und seine regulatorischen Eigenschaften	18
1.4.2	Regulation der IL-10-Expression und die Struktur des IL-10-Genlokus	18
1.4.3	IL-10-Genvariationen und die Einteilung der IL-10-SNP	19
1.4.4	Die in-vitro-Kapazität zur IL-10-Synthese	20
1.4.5	IL-10-Genvariationen bei Erkrankungen	21
1.5	Ziel dieser Dissertation	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Verbrauchsmaterial	25
2.1.3	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer	25
2.1.4	Kits	26
2.1.5	Geräte	26
2.1.6	Software	27
2.1.7	Verwendete Primer und Sonden	27
2.1.8	Blutproben und Patientenkollektiv	28
2.2	Methoden	33
2.2.1	Fließschema der Genotypisierung	33
2.2.2	Die DNS-Isolation	34
2.2.3	Qualitätskontrolle der DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.4	Das Prinzip der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.5	Die Fragmentlängenanalyse am ABI Gene-Scan 310	37

2.2.6	Die DNS-Quantifizierung mit Hilfe von Picogreen Assay.....	39
2.2.7	Die Charakterisierung von IL-1087 mittels TaqMan®-PCR	40
2.2.8	Auswertung der Fragmentlängenanalyse	42
2.2.9	Die Statistische Analyse	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Analyse von IL-10-Genvariationen an drei verschiedenen ethnischen Kohorten .	44
3.1.1	Genotypischer Vergleich der drei verschiedenen ethnischen Kohorten	44
3.1.2	Der distale und mediale Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens	46
3.1.3	Erweiterte SNP-Haplotypen der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens in verschiedenen ethnischen Gruppen	49
3.2	IL-10-Polymorphismus bei Patienten mit aggressivem NHL im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe	52
3.2.1	Die allelische und genotypische Verteilung bei Patienten mit aggressivem NHL und der gesunden Kontrollgruppe.....	52
3.2.2	Die haplotypische Verteilung bei Patienten mit aggressivem NHL und der gesunden Kontrollgruppe	54
3.2.3	IL-10-Polymorphismus in Zusammenhang mit dem Verlauf des aggressiven NHL...55	
3.2.4	Der SNP -1087 A/G im IL-10-Gen-Promotor und das klinische Ergebnis beim NHL.62	
4	Diskussion.....	65
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis.....	74
7	Publikationen in Zusammenhang mit dieser Dissertation	81

1 Einleitung

Mit konventioneller Chemotherapie lassen sich bei über 50% der Patienten mit disseminiertem aggressivem Lymphom Langzeit-Remissionen erreichen. Dennoch steigt die Inzidenz dieser Erkrankung. Und obwohl sie eine heilbare Erkrankung ist, erreichen viele Patienten nicht die komplette Remission ("complete remission", CR) oder unterliegen einem Rezidiv nach konventioneller Chemotherapie. Die genaue Ätiologie dieses Phänomens bleibt weiterhin unklar. Biologische Vorgänge und individuell unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie scheinen von den genetischen Faktoren des Patienten abhängig zu sein (Kaiser et al. 2002, Wunderlich et al. 2003).

Beweise für die bedeutende Rolle der genetischen Veranlagung zur Entstehung von Lymphomerkkrankungen werden auch durch epidemiologische Studien unterstützt, die auf ein erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bei Individuen hindeuten, die eine positive Familienanamnese oder andere maligne hämatologische Erkrankungen haben (Chatterjee et al. 2004). Da die angeborene Immunantwort und inflammatorische Reaktionen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des NHL spielen, liegt die Vermutung nahe, dass deregulierte Komponenten des Immunsystems, die für die Entstehung akuter oder chronischer inflammatorischer Reaktionen verantwortlich sind, mit der Inzidenz und dem klinischen Verlauf der Erkrankung assoziiert sein können.

Zytokine sind dabei wichtige Mediatoren der inflammatorischen Reaktion, die bei deregulierter Expression mit Transformation lymphatischer Zellen sowohl als autokrine Wachstumsfaktoren agieren als auch für die Tumorprogression und -Verbreitung verantwortlich sind.

Teil des großen Netzwerks der Zytokine ist Interleukin 10 (IL-10), das ein wichtiges immunregulatorisches Zytokin ist. IL-10 kann auf der einen Seite den Tumorprogress durch Immunsuppression und Stimulation der Zellproliferation fördern und auf der anderen Seite durch seine anti-angiogenetische Eigenschaft inhibieren (Moore et al. 2001, Cervenak et al. 2000).

Um den klinischen Verlauf von Lymphomerkkrankungen besser verstehen zu können, ist es daher wichtig, die Vorgänge der Deregulierung des Immunsystems bei dieser Erkrankung zu analysieren.

In dieser Arbeit wird die Frage behandelt, inwieweit Genvariationen im IL-10-Genlokus mit dem klinischen Verlauf des aggressiven NHL assoziiert sind.

1.1 Das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass einem NHL immer die ungehemmte Teilung von Lymphozyten bei gleichzeitigem Ausbleiben von Apoptose zu Grunde liegt. Die Folge ist, dass die Masse und Zahl der entsprechenden Lymphozyten immer mehr zunimmt und somit andere Zellen verdrängt werden (Trümper et al. 2004).

Unter dem Sammelbegriff NHL werden alle malignen Lymphome zusammengefasst, die nicht die Diagnosekriterien des Morbus Hodgkin erfüllen. Diese Zusammenfassung hat im Wesentlichen historische Gründe. Die Erkrankungen, die unter diesem Oberbegriff zusammengefasst werden, sind sehr heterogen. Das gilt sowohl für die zu Grunde liegenden genetischen Veränderungen, die immunologischen Charakteristika als auch die klinischen Erscheinungsformen. Dem entsprechend sieht auch die Behandlung der NHL sehr unterschiedlich aus. Die NHL werden in Abhängigkeit ihrer Herkunft von B-lymphatischen oder T-lymphatischen Zellen in eine B- (ca. 80 % aller NHL) und eine T-Klasse (20 %) unterteilt (Trümper et al. 2004).

Die Zahl der Non-Hodgkin-Lymphome nimmt seit einigen Jahren stetig zu. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 10 bis 15 von 100000 Menschen an einem Non-Hodgkin-Lymphom (Trümper et al. 2004). Männer erkranken geringfügig häufiger als Frauen. Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, allerdings steigt mit dem Alter die Wahrscheinlichkeit, an einem NHL zu erkranken. Die meisten Patienten sind über 60 Jahre alt und auf Grund der stetig ansteigenden Zahl älterer Menschen in Europa und den USA treten NHL in der heutigen Zeit deutlich häufiger auf (Trümper et al. 2004).

Die Ätiologie des NHL ist ungeklärt. Eine mögliche Ursache können chromosomale Veränderungen (Mutationen) sein, die ebenfalls mit dem Alter vermehrt auftreten können.

Durch Mutationen kann es zum Verlust von Tumorsuppressorgenen (Gene, die Zellwachstum hemmen) und / oder zur Aktivierung von Onkogenen (Gene, die Zellwachstum stimulieren) kommen, wodurch die veränderte Zelle einen Wachstumsvorteil erhält.

Zu den wichtigsten Beispielen für diese Entdeckungen zählen die Translokationen t(2;5) bei den großzellig anaplastischen T-Zell-Lymphomen, die t(8;14) bzw. t(2;8) und t(8;22) (c-myc-Gen Veränderung) bei den Burkitt-Lymphomen und die t(14;18) (bcl-2) bei den folliculären Keimzentrumslymphomen (Korsmeyer 1992, Korsmeyer 1999). Am Beispiel des folliculären Lymphoms wird das normalerweise auf Chromosom 18 gelegene *BCL-2*-Gen auf das Chromosom 14 übertragen, was zur Aktivierung dieses (Proto-)Onkogens und zu erhöhter Produktion des *BCL-2*-Proteins führt, welches den programmierten Zelltod (Apoptose) hemmt und zum unkontrollierten Zellwachstum führt (Korsmeyer 1992, Korsmeyer 1999). Eine für die Entstehung des aggressiv diffusen-großzelligen B-Zell-NHL bedeutende Genveränderung ist die Aktivierung des *BCL-6*-Gens (Chromosomenbande 3q27), welches für Immunglobuline kodiert und somit ähnlich wie beim *BCL-2* aktiviert wird (Neri et al. 1988).

Es werden weitere Faktoren für die Entstehung des NHL diskutiert. Ein abgeschwächtes Immunsystem wie z.B. nach Immunsuppression im Rahmen einer Transplantation oder das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung können bei dem betroffenen Patienten zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von NHL führen (Greten 2002). Einige virale Infektionen (z.B. Epstein-Barr-Virus beim Burkitt-Lymphom, Karposisarkom-Virus, etc.) und bakterielle Infektionen (z.B. *Helicobacter pylori* beim MALT-Lymphom) werden mit der Entstehung von NHL assoziiert. Auch die Exposition gegenüber chemischen Stoffen wie Herbiziden, Insektiziden, UV-Strahlung oder auch genetische Prädisposition kann zur Entstehung von Lymphomen führen (Trümper et al. 2004).

1.1.2 Das klinische Bild des NHL

Erste Symptome eines Non-Hodgkin-Lymphoms sind häufig schmerzlose zervikale Lymphknotenvergrößerungen, die durch die Vermehrung von Lymphozyten oder durch die Ansammlung von lymphknotenfremden Zellen entstehen.

Beim Befall des Knochenmarks kommt es zu gestörter Blutbildung mit daraus folgender Anämie ("Blutarmut"; Störung des Sauerstofftransports im Blut) oder Thrombopenie

(Verminderung der Blutplättchenzahl mit erhöhtem Blutungsrisiko). Unspezifische Laborparameter wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit, die Alpha-2-Globuline, die Laktatdehydrogenase und die Akut-Phase-Proteine Fibrinogen und Ferritin sind erhöht. Im Gegensatz dazu ist der Eisenwert erniedrigt. Weitere Symptome, die auftreten können, sind Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Übelkeit oder Sodbrennen sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit (Trümper et al. 2004).

1.1.3 Die Klassifikation des NHL

Die aktuelle Unterteilung der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) erfolgt nach der WHO-Klassifikation (Harris et al. 1994), die hinsichtlich der Lymphom-Entitäten im Wesentlichen der REAL-Klassifikation ("Revised European American Lymphoma") entspricht (Harris et al. 1999). Die WHO-Klassifikation klassifiziert die NHL nach zytomorphologischen, immunologischen und genetischen Merkmalen.

In Anlehnung an die WHO-Klassifikation der NHL ist die Unterteilung von Hiddemann aus dem Jahre 1996 in indolente (niedrig maligne), aggressive und sehr aggressive hoch maligne Lymphome aus klinischer Sicht sinnvoll (Hiddemann et al. 1996). Hiernach erfolgt außerdem die Unterteilung in T- und B-Zell-Lymphome (siehe Tab. 1).

Eine genaue Klassifizierung des NHL spielt für die Risikoeinschätzung und Therapieplanung eine sehr wichtige Rolle. Zur Risikoeinschätzung wird der Internationale Prognostische Index (IPI) verwendet, der retrospektiv an einem großen Patientenkollektiv etabliert wurde (Shipp 1997). Die Prognose verschlechtert sich deutlich bei Zunahme klinischer Risikofaktoren (siehe Tab. 2 und 3).

Für eine genaue Festlegung des Ausbreitungsgrades als Voraussetzung für eine stadiengerechte Therapieplanung dient die initiale Stadieneinteilung, auch Staging genannt (Greten 2002). Zum Staging gehören Röntgenuntersuchung des Thorax in 2 Ebenen, Sonographie des Abdomens, Computertomographie von Hals, Thorax und Abdomen sowie Knochenmarkspunktion für die Knochenmarkshistologie zum Ausschluss eines Knochenmarksbefalls (Greten 2002).

Tab. 1: Auszug der klinischen Einteilung der NHL (mod. nach Harris et al. 1999; S. 3840).

<u>B-Zell-Lymphome</u>	<u>T-Zell-Lymphome</u>
	Indolent
Chronische lymphatische Leukämie	"Large Granular Lymphocyte"-Leukämie
"Small Lymphocytic Lymphoma" (SLL)	(LGL)
	T- und Natürliche-Killerzellen-Typ
Lymphoplasmazytoides Lymphom, Immunozytom	Mycosis fungoides
Haarzell-Leukämie	Sezary-Syndrom
	Smolderig und chronische "Adulte T-Zell- Leukämie" (ATL)
Marginalzonenlymphom	
Follikuläres B-NHL Grad I-II	
	Aggressiv
Prolymphozytenleukämie	Prolymphozytenleukämie
Mantelzell-Lymphom	Peripheres T-NHL, unspezifiziert
Follikuläres B-NHL Grad III	Angioimmunoblastisches Lymphom
Diffus-großzelliges B-NHL	Anaplastisches großzelliges Lymphom
Primär mediastinales großzelliges B-NHL	
	Sehr aggressiv
B-lymphoblastisches Lymphom	T-lymphoblastisches Lymphom
B-lymphoblastische Leukämie	T-lymphoblastische Leukämie
Burkitt-NHL/B-ALL	Adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom

Tab. 2: Klinische Risikofaktoren beim aggressiven NHL entsprechend dem Internationalen Prognostischen Index (IPI), die für eine ungünstige Prognose sprechen (Shipp 1997; S. 45).

Klinische Risikofaktoren beim NHL

- Alter über 60 Jahre
- Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe (Stadium III oder IV nach Ann-Arbor)
- Zwei oder mehrere extranodale Manifestationen
- Schlechter Allgemeinzustand (starker Gewichtsverlust, Schwäche)
- LDH im Blutserum größer als 250 U/l (oberer Normwert, ONW)

Tab. 3: Prognostische Gruppen beim aggressiven NHL entsprechend dem IPI (n > 3000 Patienten) (Shipp 1997; S. 45).

<u>Risikogruppe</u>	<u>Anzahl der klinischen Risikofaktoren</u>	<u>Komplette Remission (CR)</u>	<u>5-Jahres-Überlebensrate</u>
niedrig	0 bis 1	87%	73%
niedrig-intermediär	2	67%	50%
hoch-intermediär	3	55%	43%
hoch	4 bis 5	44%	26%

1.1.4 Therapiemöglichkeiten des aggressiven NHL

Aggressive NHL werden in kurativer Intention behandelt, da auch eine dauerhafte Remission und Heilung in fortgeschrittenen Stadien erzielt werden können (Armitage et al. 1984, Armitage 1993). Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome sind durch ein aggressives und rasches Wachstum der Tumorzellen gekennzeichnet und werden mit einer Kombinationschemotherapie behandelt. Die Standard-Kombinationschemotherapie folgt dem CHOP-Schema, das aus den Zytostatika Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin und Prednisolon besteht und gegebenenfalls um die Substanz Etoposid (CHOEP) oder den Antikörper Rituximab (R-CHOP) erweitert werden kann.

Die Zytostatikagabe von sechs bis acht Wochen schädigt nicht nur die DNS der malignen Lymphomzellen, sondern auch gesunde Zellen werden in ihrer Funktion stark beeinträchtigt. So ist der Patient z.B. auf Grund einer eingeschränkten Blutbildung durch Infektionen und Blutungen erheblich gefährdet. Diese Komplikationen können jedoch durch Wachstumsfaktoren der Blutbildung (Erythropoetin, G-CSF oder GM-CSF) behandelt werden (Trümper et al. 2004).

Die Kombinationschemotherapie kann gegebenenfalls mit einer Strahlentherapie kombiniert werden. Bei sehr großen Lymphomen, bei Befall außerhalb von Lymphknoten oder wenn nach der Chemotherapie noch Tumorreste vorhanden sind, kann sich eine Bestrahlung je nach Behandlungssituation mit 20 bis 40 Gray anschließen. Ebenso ist eine Kombination aus Hochdosis-Chemotherapie mit Transplantation von autologen (eigenen) Stammzellen aus dem peripheren Blut möglich (Trümper et al. 2004).

1.2 Das Non-Hodgkin-Lymphom – Eine Erkrankung des Immunsystems

Das Non-Hodgkin-Lymphom ist eine Erkrankung des Immunsystems und unterliegt komplexen biologischen Vorgängen, die durch eine Vielzahl von Zytokinen gesteuert werden. Die Deregulierung dieser Faktoren beeinflusst die Inzidenz und den klinischen Verlauf des malignen Lymphoms (Caligaris-Cappio 2001).

So haben Patienten mit einem hohen TNF-Wert im Plasma ein schlechteres Krankheitsbild der malignen Lymphom-Erkrankungen (Salles et al. 1996, Warzocha et al. 1997). Zahlreiche Studien haben außerdem gezeigt, dass eine exzessive Produktion von TNF Gewichtsverlust, Kachexie, die Immunantwort und die Anämie negativ beeinflusst und die Therapie des Tumors behindert. Dazu haben andere Experimente gezeigt, dass TNF das Wachstum bestimmter lymphatischer Zellen fördert (Salles et al. 1996, Warzocha et al. 1997, Cordingley et al. 1988, Tracey et al. 1988, Tracey 1995).

Die Expression und Ausschüttung des Zytokins Interleukin-10 (IL-10) ist ebenfalls beim Non-Hodgkin-Lymphom dereguliert. Ein erhöhter IL-10-Wert im Plasma ist mit einem schlechten Verlauf des Non-Hodgkin-Lymphoms assoziiert. Das Ausmaß der Sekretion von Zytokinen und somit auch die Intensität der Immunantwort variiert individuell. Es wurde festgestellt, dass verschiedene genetische Elemente in Zytokin-Genen mit unterschiedlicher Sekretion von Zytokinen zum Teil auch mit dem Ausmaß einer Erkrankung assoziiert sind (Bidwell et al. 2001, Haukim et al. 2002, Blay et al. 1993, Benjamin et al. 1994). Diese regulatorischen Polymorphismen sind daher unter anderem für die inter-individuellen Unterschiede bei der Immunantwort auf Erkrankungen verantwortlich.

1.3 Genvariationen

Es gibt Hinweise darauf, dass einige Variationen der Zytokin-Gene die Expressionshöhe und somit auch die Wirkung des entsprechenden Zytokins beeinflussen. Die Menge der Zytokine, die individuell unterschiedlich sezerniert wird, hat dementsprechend unterschiedliche Auswirkungen auf die Intensität der Immunantwort (Ross et Caligiuri 1997).

Genvariationen werden auch als genetische Polymorphismen bezeichnet, wonach definitionsgemäß eine Genvariation mit einer Häufigkeit (Allelfrequenz) von mehr als einem Prozent in der Population auftritt (Seyffert 2003). Andernfalls spricht man von einer Mutation. Eindeutiger wäre in diesem Zusammenhang der Begriff Sequenzvariation, welcher sich aber noch nicht vollständig durchgesetzt hat. Drei Arten von Sequenzvariationen lassen sich unterscheiden:

- Einzelnukleotidpolymorphismen („single-nucleotide-polymorphisms“, SNP)
- Insertions- und Deletionspolymorphismen
- Multiplikationen.

Die häufigsten Sequenzvariationen sind die Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), bei denen es zum Austausch eines Nukleotids im DNS-Molekül kommt. Es wird von einem SNP auf 200 - 1000 Basenpaare im menschlichen Genom ausgegangen. Liegt der SNP im kodierenden Bereich einer Gen-Sequenz, so kann ein Aminosäureaustausch im resultierenden Protein die Folge sein (Seyffert 2003). Da aber viele Aminosäuren von mehreren Basentriplets kodiert werden, führt nicht jeder Basenaustausch in der DNS zwingend zu einem Aminosäureaustausch im Protein, so dass nicht jeder Polymorphismus unbedingt eine wichtige Bedeutung haben muss.

Wird ein kurzes Basenpaarmuster sogar zweimal oder mehrmals hintereinander in einem DNS-Strang wiederholt, so spricht man von einem "short tandem repeat" (STR) oder auch von Mikrosatelliten. Die Basenpaarmuster können aus zwei bis zu sechs Basenpaaren bestehen, das Auftreten von Wiederholungen liegt in der Regel zwischen fünf bis fünfzig. STRs sind bei der Identifizierung von Individuen und Verwandtschaftsanalysen von Bedeutung, da die Anzahl der Musterwiederholungen auch zwischen Verwandten verschieden sein kann.

Unter einer Insertion oder dem Gegenteil, einer Deletion, versteht man den Einbau bzw. den Verlust von mindestens einem Nukleotid. Sind beide Allele betroffen, kann dies zu einem Aktivitätsverlust für das Genprodukt, z.B. ein Enzym, führen.

Multiplikationen (Verdoppelungen, Vervielfachungen) betreffen schließlich das gesamte Gen, was eine erhebliche Erhöhung der Stoffwechselkapazität des betroffenen Genprodukts verursachen kann.

1.4 Interleukin-10 (IL-10)

1.4.1 Interleukin-10 und seine regulatorischen Eigenschaften

Interleukin-10 (IL-10) ist Teil des großen Netzwerks der Zytokine und ein wichtiges immunregulatorisches Zytokin, das als inhibitorischer Faktor für die Zytokin-Synthese beschrieben wird. So inhibiert IL-10 z.B. die Synthese von Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF und TNF (de Waal Malefyt et al. 1991). IL-10 kann auf der einen Seite den Tumor-Progress durch Immunsuppression und Stimulation der Zellproliferation fördern und auf der anderen Seite den Tumor-Progress durch seine anti-angiogenetische Eigenschaft inhibieren (Moore et al. 2001, Cervenak et al. 2000).

IL-10 unterdrückt die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-2-Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen, so dass die Entzündung eingedämmt wird (de Waal Malefyt et al. 1992, Moore et al. 1993). Außerdem ist IL-10 ein wichtiger Bestandteil der T_{H2}-Immunantwort, da es von T_{H2}-Zellen sezerniert wird und dadurch B-Lymphozyten zur Proliferation, Differenzierung und Antikörperbildung von IgM, IgG und IgA stimuliert werden (Burdin et al. 1997, Rousset et al. 1991). Neben seiner Bildung durch neoplastische B-Zellen, stimulierte Monozyten, Makrophagen und T-Zellen hat IL-10 weitere Funktionen bei bestimmten Infektions- sowie Autoimmunerkrankungen, der Transplantat-Toleranz und der Tumorgenese (Moore et al. 2001, Blay et al. 1993, Benjamin et al. 1994).

1.4.2 Regulation der IL-10-Expression und die Struktur des IL-10-Genlokus

Die Expression von IL-10 wird im Allgemeinen von einer Reihe anderer Zytokine reguliert. So inhibieren IL-4, IL-13 und IFN-gamma die IL-10-Produktion in LPS-aktivierten Monozyten (Chomarat et al. 1993, de Waal Malefyt et al. 1993). IL-10 inhibiert die IL-10-mRNA-Synthese und reguliert sich somit selbst (de Waal Malefyt et al. 1993). IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, und IL-15 induzieren die IL-10-Produktion in Monozyten, T-Zellen, Natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Mastzellen (Tilg et Peschel 1996, Cohen et al. 1997, Foey et al. 1998).

TNF induziert die IL-10-Synthese in Monozyten, während IFN-gamma die IL-10-Synthese sowohl in Monozyten als auch in humanen T-Zellen induziert (Barsig et al. 1995, Aman et al. 1996, Rep et al. 1996).

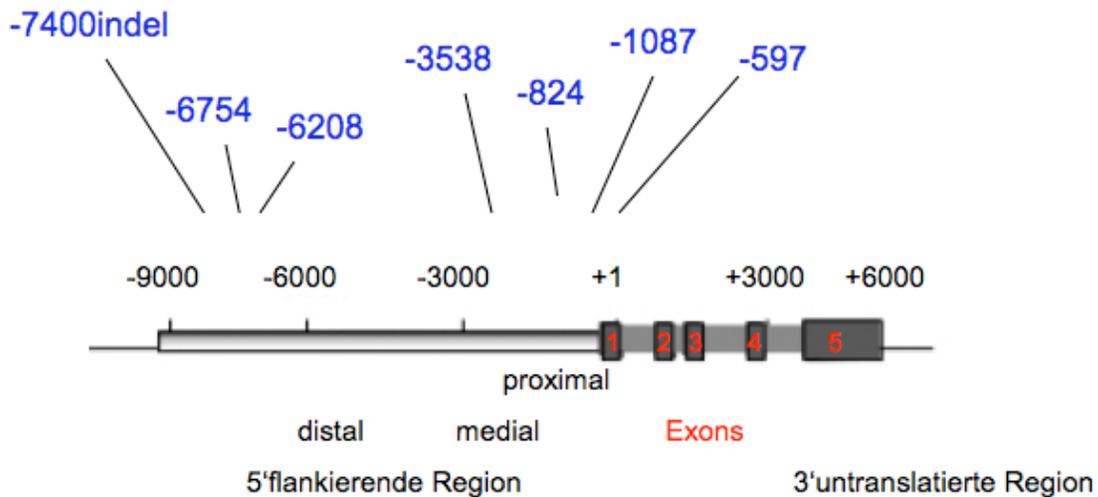
Das Gen für IL-10 liegt auf Chromosom 1 zwischen 1q31 und 1q32 und besteht aus fünf Exons und vier Introns, die zusammen einen Bereich von 4700 bp umfassen. Die Expression und Sekretion von IL-10 unterliegt somit genetischen Einflüssen (de Waal Malefyt et al. 1993).

In der 5' flankierenden Region vom Startpunkt der Transkription der kodierenden Region des IL-10-Gens befindet sich der Promotorbereich, welcher hoch variabel ist. Die ersten ca. 350 bp 5' seitig des Transkriptionsstartpunktes sind essentiell für die Basis-Promotoraktivität des IL-10. Positiv regulatorische Elemente wurden zwischen -1100/ -900, negativ regulatorische Elemente zwischen -800/ -300 identifiziert (Kube et al. 1995). Einige Polymorphismen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens beeinflussen interindividuell unterschiedlich die IL-10-Produktion. Es wurde bereits von verschiedenen Assoziationen zwischen der Kapazität der IL-10-Produktion und den IL-10-Mikrosatelliten und SNP berichtet (Turner et al. 1997, Gibson et al. 2001, Eskdale et al. 1998, Crawley et al. 1999, Mormann et al. 2004).

1.4.3 IL-10-Genvariationen und die Einteilung der IL-10-SNP

Die größte Gruppe der Genvariationen in der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens stellen die SNP dar. Die SNP lassen sich in drei wesentliche Gruppen nach ihrer Position einteilen. Erstens, die am längsten bekannte und somit am besten untersuchte Gruppe der proximalen SNP, zu der z.B. IL-10 -597 A/C, -824 C/T, und -1087 A/G gehören. Zur zweiten Gruppe gehören die medialen SNP, z.B. IL-10 -1354 A/G, -2736 A/C und -3538 A/T. Die letzte Gruppe umfasst die distalen SNP IL-10 -6208 C/G, -6752 A/T und -7400 in/del. Die Genvariation an der Stelle -7400 nimmt hier eine Sonderstellung ein, da es sich dabei um eine Insertion bzw. Deletion der drei Basen AGG handelt.

Abb. 1: Schematische Darstellung des Interleukin-10-Gens sowie die zugehörige proximale, mediale und distale 5' flankierende Region mit den untersuchten Polymorphismen des IL-10-Gens (mod. nach Kube et al. 2001 a; S. 185).



1.4.4 Die in-vitro-Kapazität zur IL-10-Synthese

In den meisten veröffentlichten Studien wird der proximale Haplotyp ACC/ATA/GCC (aus den SNP IL-10 -1087AG, IL-10 -824CT und IL-10 -597AC) mit der in-vitro-Kapazität der IL-10-Produktion in Verbindung gebracht (Turner et al. 1997, Gibson et al. 2001, Eskdale et al. 1998, Crawley et al. 1999, Mormann et al. 2004). GCC wird als IL-10-"high-producer"-Haplotyp definiert, während ATA als IL-10-"low-producer"-Haplotyp identifiziert wurde (Crawley et al. 1999). Dies zeigt, dass die Genvariationen innerhalb des IL-10-Gens "in vivo" von relevanter Bedeutung sein können.

Der SNP -1087 ist besonders umfassend analysiert. So konnte die Arbeitsgruppe von Turner erstmals in vitro zeigen, dass die Stimulation von peripheren Lymphozyten mit ConA (Concanavalin A) eine signifikant erhöhte IL-10-Synthesekapazität für das IL-10 -1087 G-Allel ergab (Turner et al. 1997).

Die beiden Mikrosatelliten IL-10.G (bei ca. -1120 bp) und IL-10.R (bei ca. -3960 bp) stellen beide CA-Wiederholungen dar, die auch "short tandem repeats" (STR) genannt werden. Diese

beiden Mikrosatelliten wurden in den Jahren 1995 und 1996 von Eskdale und seiner Arbeitsgruppe erstmals beschrieben (Eskdale et Gallagher 1995, Eskdale et al. 1996). IL-10.G hat 19 bis 28, IL-10.R hat 12 bis 15 CA-Wiederholungen. Die Anzahl der CA-Wiederholungen entspricht der Länge der Mikrosatelliten, die Einfluss auf die Gen-Regulation haben. Für verschiedene Haplotypen oder Allele dieser Mikrosatelliten wurden verschiedene IL-10-Sekretionsmuster beobachtet. 1998 wurde von der Arbeitsgruppe von Eskdale bewiesen, dass diese beiden Mikrosatelliten Einfluss auf die IL-10-Sekretion haben (Eskdale et al. 1998). LPS-stimulierte Zellen, deren Haplotyp das Allel IL-10.R 3 trugen, zeigten im Vergleich zu allen anderen Allelen dieses Mikrosatelliten die geringste Sekretion von IL-10. Der Haplotyp IL-10.G 14 / IL-10.R 2 (26 bzw. 13 CA-Wiederholungen) zeigte die höchste IL-10-Sekretion, während der Haplotyp IL-10.G 7 / IL-10.R 3 (19 bzw. 14 CA-Wiederholungen) die niedrigste IL-10-Sekretion aufwies. In der haplotypischen Betrachtung der Mikrosatelliten mit den drei genannten proximalen SNP zeigte der Haplotyp IL-10.R 2 / IL-10.G 10 / ACC (IL-10.R, IL-10.G, IL-10 -1087, IL-10 -824, IL-10 -597) eine sehr hohe Sekretion von IL-10 (Eskdale et al. 1998). Das Allel IL-10.R 3 (14 CA-Wiederholungen) war fast ausschließlich mit dem Haplotyp GCC (-1087G, -824C, -597C) assoziiert, das Allel IL-10.R 2 (13 CA-Wiederholungen) war dagegen gleich häufig mit allen Haplotypen GCC, ACC und ATA anzutreffen (Eskdale et al. 1999).

1.4.5 IL-10-Genvariationen bei Erkrankungen

Verschiedene Studien lassen vermuten, dass der Polymorphismus am proximalen IL-10-Promotorbereich mit der Inzidenz bzw. mit dem klinischen Verlauf von verschiedenen infektiösen und inflammatorischen Erkrankungen wie Lupus Erythematodes, Meningitis, Asthma, Sjögren-Syndrom, juvenile rheumatoide Arthritis und entzündliche gastro-intestinale Erkrankungen assoziiert ist (Westendorp et al. 1997, Eskdale et al. 1997, Lim et al. 1998, Hulkkonen et al. 2001, Crawley et al. 1999, Koss et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass genetische Variationen innerhalb vom beschriebenen IL-10-Lokus funktionell auch in vivo relevant sein können.

IL-10 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Erreger-bedingten Erkrankungen wie der Malaria, den Epstein-Barr-Virus-assoziierten Tumoren, Zytomegalie-

Virus-assoziierten Erkrankungen oder bei der Entstehung der Schistosomiasis, Neurodermitis und nicht zuletzt des malignen B-Zell-Lymphoms. Die Expression von IL-10 ist bei diesen Erkrankungen gestört, vor allem beim malignen B-Zell-Lymphom.

Aktuelle Analysen liefern den Beweis, dass das klinische Bild beim Patienten mit diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) mit bestimmten IL-10-Promotor-Genvariationen in Zusammenhang steht. So wurde in einer Studie von Cunningham berichtet, dass proximale Genotypen oder Haplotypen mit einer erniedrigten IL-10-Produktion einen Risikofaktor für das aggressive Lymphom darstellen (Cunningham et al. 2003). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen stellte die Vermutung auf, dass Genotypen, die mit einer erhöhten Expression von IL-10 in Zusammenhang stehen, das Risiko für die Entwicklung einer Lymphomerkkrankung bei Patienten mit AIDS erhöhen (Breen et al. 2003).

Die hier genannten Untersuchungen, in denen Polymorphismen am proximalen IL-10-Promotorbereich mit verschiedenen Erkrankungen in Beziehung gesetzt werden, sind sehr kontrovers, zeigen aber deutlich die klinische Relevanz dieser Dissertationsarbeit, die sich nicht nur auf den proximalen Bereich, sondern auch auf den medialen und distalen Bereich des IL-10-Gens konzentriert.

1.5 Ziel dieser Dissertation

Ziel dieser Dissertation ist die Beantwortung der Frage, inwieweit Genvariationen in der 5' flankierenden Region des IL-10 mit dem aggressiven NHL assoziiert sind, um daraus unter Berücksichtigung bisheriger Erkenntnisse prognostische Aussagen über den Verlauf dieser Erkrankung machen zu können.

Zunächst wird die Methode des Nachweises von Genvariationen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens erweitert, um diese an drei verschiedenen ethnischen Gruppen anzuwenden. Hierzu sollen die Allelfrequenzen der untersuchten IL-10-Polymorphismen an IL-10 -7400, IL-10 -6752, IL-10 -6208, IL-10 -3538, IL-10 -1087, IL-10 -824 und IL-10 -597 mittels Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) an einer afrikanischen, kaukasischen und vietnamesischen Gruppe untersucht und miteinander verglichen werden. Zusätzlich wird der SNP IL-10 -1087 mittels TaqMan®-PCR gesondert analysiert.

Anschließend werden DNS-Proben einer repräsentativen Gruppe von Patienten mit aggressivem NHL aus der NHL-B1/B2-Studie der „Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome“ mit der gleichen Methode untersucht. Dabei wird die Suszeptibilität, an einem aggressiven Lymphom zu erkranken, ermittelt, indem die Daten zur Allel- und Genotypenverteilung der Patientengruppe mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Danach werden die Genotypen in diesem Patientenkollektiv analysiert und deren Gesamtüberleben (OS, "overall survival") und ereignisfreies Überleben (EFS, "event free survival") miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

1 Kb DNS-Leiter	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Agarose	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Borsäure	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
CXR-400-Längenstandard	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
DNS-Längenstandard (1 Kb DNS-Leiter)	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Formamid	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Master-Mix für TaqMan®-PCR	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Orange G	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
PCR-Nukleotiden-Mix (dNTP)	Roche GmbH (Mannheim, Deutschland)
Pico-Green-dsDNS-Reagenz	MoBiTec GmbH (Göttingen, Deutschland)
Platinum Taq DNS-Polymerase	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
POP4	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Hydrochlorid (1M, pH 8)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden im Einzelnen von den angegebenen Quellen bezogen:

384-Well-Plates	Applied Biosystems (Foster City, USA)
48-Well-Plates	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Aqua destillata	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Crystaltips (10 μ l Filtertips)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Genetic Analyser-Septen (0,5 ml Tubes)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Microtest 96 Well-Assay-Platten (PCR)	Corning (NY, USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen (100 μ l)	Gilson (Bad Camberg, Deutschland)
Pipettenspitzen (20-200 μ l)	Gilson (Bad Camberg, Deutschland)
Sterile Filtertips (10-100 μ l Sterilfilter)	Biozym (Oldendorf, Deutschland)

2.1.3 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

8% Orange Lösung: Gesamtvolumen 100 ml

8 g Orange G

50 ml Glycerol 50%

5 ml 0,5x TBE

aqua dest. ad 100 ml

5x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Elektrophoresepuffer): Gesamtvolumen 1 Liter

54 g Trischlorid

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA 0,5 M

aqua dest. ad 1000 ml

(ph 8,0)

Tris-Hydrochlorid-EDTA-Puffer (TE-Puffer): Gesamtvolumen 1 Liter

10 ml einer 1M Tris-Hydrochlorid

0,1 ml einer 1M EDTA

aqua dest. ad 1000 ml

(ph 8,0)

2.1.4 Kits

Es wurde folgendes Kit für die DNS-Extraktion verwendet:

Blood Amp Mini Kit

Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.5 Geräte

ABI Prism 7900HT Sequence Detection
System

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

Computer Power Macintosh G3

Apple Computers (Cupertino, USA)

Elektrophorese-Kammer

Biotech Fischer (Reiskirchen, Deutschland)

Mikrowelle NN-A873

Panasonic (Hamburg, Deutschland)

Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml – Pipetman)

Gibco (Eggenstein, Deutschland)

Schüttelgerät

Vortex Genie 2 Schmitt Labortechnik

Sequenzierer ABI 310

Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Thermocycler-UNOII mit 48-Well Silber-
Block

Biometra (Göttingen, Deutschland)

UV-Transluminator und Videosystem

LTF Labortechnik (Wasserburg,
Deutschland)

Zentrifuge

Biofuge primo R Eppendorf (Hamburg,
Deutschland)

2.1.6 Software

Folgende Software wurde zur Editierung und Verwaltung von DNS-Sequenzen verwendet:

ABI 310 Gene-Scan	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
ABI SDS Software	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

2.1.7 Verwendete Primer und Sonden

Die verwendeten Primer wurden entweder von Eurogentec (Seraine, Belgien) oder Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) hergestellt. Die verwendeten Primer sind mit Farbstoff markiert und fluoreszieren (siehe Tab. 4 und 6).

Tab. 4: Die in der Multiplex-PCR verwendeten Oligonukleotide mit Angabe der Endkonzentration.

Genlokus	Sequenz 5' – 3'	Farbstoff	Endkonzentration (ng/ μ l)
IL-10 -7400 in/del	TTGAACTCCTAGCTCAAGTAATCCT	-	0,25
IL-10 -7400 in/del	GAAGGAACATCTGAGCTGAGAGCT	NED	0,25
IL-10 -597 A	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTA	FAM	0,57
IL-10 -597 C	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTC	HEX	0,72
IL-10 -597	GTGACGTGGACAAATTGCCCATTC		0,72
IL-10 -3538 A	CAATGCTTATTATACTGATTTTAAATGT	FAM	2,30
IL-10 -3538 T	CAATGCTTATTATACTGATTTTAAATGA	HEX	2,45
IL-10 -3538	ACGGGTCCTGGATGACATCTGAGT		2,30
IL-10 -6208 C	TCAATCTATCACCAGAACCTCCAG	FAM	1,15
IL-10 -6208 G	TCAATCTATCACCAGAACCTCCAC	HEX	1,89
IL-10 -6208	CCCTGGGCTTAGATTTGTGGTGCA		1,15
IL-10 -6752 A	CCTTTGCAGCCTCCATACCAGTGT	FAM	0,32
IL-10 -6752 T	CCTTTGCAGCCTCCATACCAGTGA	HEX	0,40
IL-10 -6752	GGGCTACAAAGTCCAGCAGAGTCA		0,32

In Tabelle 5 sind die analysierten Genvariationen jeweils mit der dazugehörigen RS-Nummer aufgelistet. In der SNP-Datenbank (dbSNP) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) sind über 5 Millionen validierte SNP für Homo sapiens gelistet. Jeder SNP, der in der Datenbank gelistet werden soll, bekommt initial eine sogenannte SNP-ID, also eine Nummer zur genauen Identifikation. Ein SNP, der bei seiner Registrierung in der

Datenbank bisher noch nicht gelistet ist, hat ein „rs“ vor seiner Identifikationsnummer, was für "reference SNP" steht.

Tab. 5: Die analysierten IL-10-Genvariation und ihre RS-Nummer

	<u>IL-10-Genvariation</u>	<u>RS-Nummer</u>
proximal	-597 A/C	rs 1800872
	-1087 A/G	rs 1800896
medial	-3538 A/T	rs 1800890
distal	-6208 C/G	rs 10494879
	-6752 A/T	rs 6676671
	-7400 in/del	

Tab. 6: Die in der TaqMan®-PCR verwendeten Oligonukleotide und Sonden

Primer	Sequenz 5'-3'
IL10RealF1087AG	ACA CAC ACA AAT CCA AGA CAA CACT
IL10RealR1087AG	GCT GGA TAG GAG GTC CCT TAC TTT
Sonden	
IL10_1087_G	FAM_TCC CCC TCC CAA AG_MGB
IL10_1087_A	VIC_TCC CCT TCC CAA AGA_MGB

2.1.8 Blutproben und Patientenkollektiv

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurden 143 vietnamesische, 209 europäische und 127 afrikanische gesunde Spender untersucht. Alle Proben wurden unabhängig von Geschlecht und Alter ausgewählt. Die DNS der aus Vietnam stammenden Spender wurde von Dr. med. Song aus Vietnam bereitgestellt. Die DNS der aus Stuttgart stammenden Spender wurde von der Blutspendezentrale aus Stuttgart bereitgestellt. Die DNS der afrikanischen Kohorte stammte aus Lambarene, Gabun, und wurde bereits in einer früheren Arbeit analysiert (Kube et al. 2001 b).

Im zweiten Teil wurde eine repräsentative homogene und gleich behandelte Kohorte aus 500

Patienten mit aggressivem NHL aus der NHL-B1/B2-Studie der „Deutschen Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome“ ("German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group", DSHNHL) und eine entsprechende ethnisch unabhängige Kontrollgruppe von 191 Personen analysiert.

Die Deutsche Studiengruppe für hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (DSNHL) wurde 1993 gegründet. Im Rahmen ihrer ersten Studiengeneration wurde in einer prospektiven, randomisierten Phase-III-Studie, die auch NHL-B1/B2-Studie genannt wird, geprüft, ob mittels einer Intensivierung der Dosis durch Verkürzung des Zeitintervalls der Gabe oder durch zusätzliche Gabe von Etoposid zur CHOP-Therapie eine Verbesserung des Therapieergebnisses erreicht werden kann. Die Ergebnisse der NHL-B1/B2-Studie wurden inzwischen von Pfreundschuh et al. publiziert (Pfreundschuh et al. 2004 a, Pfreundschuh et al. 2004 b)

Die Studie wurde im Einklang mit den ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen nach der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission genehmigt. Alle Patienten wurden vorher ausführlich aufgeklärt und mussten eine Einwilligungserklärung für ihre Teilnahme unterschreiben. Teilnahmeberechtigt waren alle Patienten, die vorher nicht bereits therapiert worden waren, deren Diagnose durch eine Biopsie histologisch gesichert war und bei denen nach der WHO-Klassifikation ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom vorlag.

Die Chemotherapie CHOP ist eine Kombinationstherapie und besteht aus Cyclophosphamid, Doxorubicin und Vincristin, die am ersten Tag intravenös gegeben werden. Prednisolon wird vom ersten bis zum fünften Tag oral gegeben. Die zusätzliche Gabe von Etoposid in der CHOEP-Therapie erfolgt vom ersten bis zum dritten Tag.

In der NHL-B2-Studie wurden 689 Patienten im Alter von über 20 Jahren für 6 Zyklen CHOP- oder CHOEP-Therapie randomisiert, die sich jeweils nach 2 oder 3 Wochen wiederholten (CHOP- bzw. CHOEP-21 und CHOP- bzw. CHOEP-14). Die Patienten im zweiwöchigen Therapie-Regime bekamen vom vierten bis dreizehnten Tag Filgrastim (Granulozyten-Koloniestimulationsfaktoren = G-CSF), um die hämopoetische Genesung zu beschleunigen. Bei extranodaler Beteiligung oder auch bei einem initialen Bulky Tumor bekamen die Patienten zusätzlich eine Radiotherapie mit 36 Gy. Die NHL-B2-Studie konnte zeigen, dass die Reduzierung der CHOP-Therapie von 3 auf 2 Wochen (CHOP-21 auf CHOP-

14) zu einem besseren Ergebnis der Chemotherapie führte (komplette Remissionsrate (CR): 60,1% CHOP-21 bzw. 76,1% CHOP-14).

Unter den gleichen Bedingungen wurde in der NHL-B1-Studie 710 Patienten im Alter zwischen 18 und 60 Jahren für 6 Zyklen CHOP- oder CHOEP-Therapie randomisiert, die sich jeweils nach 2 oder 3 Wochen wiederholten (CHOP- bzw. CHOEP-21 und CHOP- bzw. CHOEP-14).

Die NHL-B1-Studie zeigte, dass die CHOEP-Therapie bei jüngeren Patienten zu empfehlen ist. Die zusätzliche Gabe von Etoposid führte nämlich im Vergleich zur CHOP-Therapie zu einer besseren kompletten Remissionsrate (CR: 87,6% CHOEP-21 bzw. 79,4% CHOP-21). Eine Reduzierung des Intervalls verbesserte sogar die Gesamtüberlebensrate (Pfreundschuh et al. 2004 a, Pfreundschuh et al. 2004 b).

In der gesamten Studie wurden 500 Patienten analysiert und ausgewertet. Deren klinische Charakteristika sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt und gelten als repräsentativ zu den 1399 Patienten der NHL-B1/B2-Studie.

Der Progress und das Ausmaß der Erkrankung wurden entsprechend der Ann-Arbor-Klassifikation zugeordnet, der Status der Erkrankung hingegen konnte unter Berücksichtigung der Kriterien der "Eastern Cooperative Oncology Group" (ECOG) eingeschätzt werden (siehe Tab. 7). Das ereignisfreie Überleben (EFS) definiert den Zeitraum von Beginn der Therapie an bis zur Progression der Erkrankung unter Therapie oder das Nicht-Erreichen der kompletten Remission. Die Gesamtüberlebensrate (OS) ist definiert als Prozentsatz noch lebender Individuen in dem Zeitraum zwischen Therapiebeginn und der letzten Nachuntersuchung bzw. dem Tod durch unterschiedliche Ursachen.

Tab. 7: ECOG-Kriterien der Patienten der NHL-B1/B2-Studie (n = 1399) und der analysierten Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom mit diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) (n = 500).

2.1.8.1 ECOG-Kriterien	Alle Patienten der NHL B1/B2 Studie (n = 1399)	Analysierte Patienten (n = 500)
Geschlecht		
weiblich	610 (44%)	220 (44%)
männlich	789 (56%)	280 (56%)
Mittleres Alter	60	62
(Min., Max.)	(18; 75)	(23; 75)
Serum LDH	316 (23%)	123 (25%)
LDH > 250 U/l		
Alter		
Patienten älter als 60 Jahre	689 (49%)	273 (55%)
Status der Erkrankung (ECOG >1)		
≥ 2	163 (12%)	65 (13%)
Ann-Arbor-Stadium III, IV	567 (41%)	202 (40%)
Vorhandensein von B-Symptomen (ungünstige Prognose)	402 (29%)	142 (28%)
International prognostischer Index der Risiko-Gruppen (IPI)	840 (60%)	280 (56%)
niedrig: IPI 0, 1	250 (18%)	99 (20%)
fortgeschritten niedrig: IPI 2	170 (12%)	67 (13%)
fortgeschritten hoch: IPI 3	139 (10%)	54 (11%)
hoch: IPI 4, 5		
Anzahl extranodaler Herde		
≥ 2	276 (20%)	104 (21%)
Vorhandensein von Bulky Tumor (≥ 10 cm)	467 (33%)	164 (33%)

Tab. 8: Die Histologie der Patienten der NHL B1/B2 Studie (n = 1399) und der analysierten Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom mit diffus-großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) (n = 500).

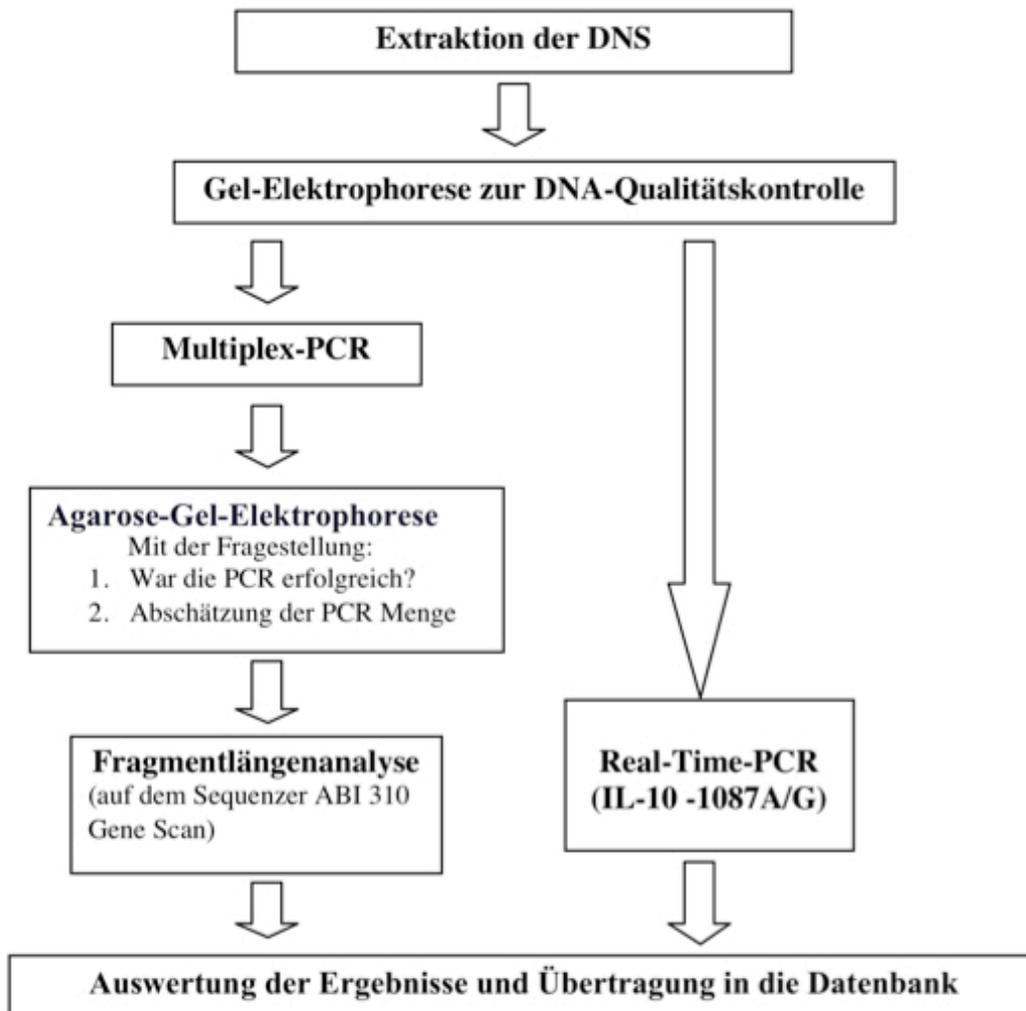
Histologie	Alle Patienten der NHL B1/B2-Studie (n = 1399)	Analysierte Patienten (n = 500)
B-Zell	1256 (89.6%)	454 (90.8%)
Diffus groß	938 (67.0%)	324 (64.8%)
Zentroblastisch	687 (49.1%)	247 (49.4%)
Immunoblastisch	114 (8.1%)	37 (7.4%)
T-Zell-reiches B-Zell	24 (1.7%)	7 (1.4%)
Anaplastisch	28 (2.0%)	14 (2.8%)
Mediastinal B-Zell	25 (1.8%)	5 (1.0%)
Nicht spezifizierbar	60 (4.3%)	14 (2.8%)
Follikulär Grad 3b	105 (7.5%)	38 (7.6%)
Burkitt-Lymphom	35 (2.5%)	22 (4.4%)
Lymphoblastisch	2 (0.1%)	1 (0.2%)
Unspezifizierbar aus technischen Gründen	74 (5.3%)	30 (6.0%)
Nicht spezifizierbar	102 (7.2%)	39 (7.8%)
T-Zell	93 (6.6%)	31 (6.2%)
Anaplastisch großzellig	45 (3.2%)	15 (3.0%)
Peripher T-Zell, unspezifisch	31 (2.2%)	11 (2.2%)
Lymphoblastisch	3 (0.2%)	1 (0.2%)
Angioimmunoblastisch	3 (0.2%)	1 (0.2%)
Extranodal NK/T, nasaler Typ	6 (0.4%)	-
Unspezifizierbar aus technischen Gründen	1 (0.1%)	-
Nicht spezifizierbar	4 (0.3%)	3 (0.6%)
Lymphoblastisch, nicht spezifizierbar	4 (0.3%)	1 (0.2%)
Anaplastisch großzellig, nicht spezifizierbar	46 (3.3%)	14 (2.8%)

2.2 Methoden

2.2.1 Fließschema der Genotypisierung

Die Adaption der Multiplex-PCR an die gegebenen Laborbedingungen bis hin zur Genotypisierung der DNS der Kohorten, in der die Allel- und Genotypfrequenzen von bestimmten Genvariationen untersucht werden sollten, erforderte eine Versuchsabfolge in mehreren Schritten. In der unteren Abbildung werden die einzelnen Schritte im Überblick beschrieben.

Abb. 2: Fließschema der Genotypisierung



2.2.2 Die DNS-Isolation

Die Isolierung der genomischen DNS aus den Blutproben wurde zur Ergänzung bzw. Erhöhung der Fallzahlen durchgeführt. Die kaukasischen, afrikanischen und vietnamesischen Blutproben waren vorwiegend bereits durch andere Arbeitsgruppen isoliert worden (Kube et al. 2003, Song et al. 2003). Die DNS der NHL-Patientengruppe sowie der gesunden Kontrollgruppe wurde nach demselben Protokoll isoliert.

Die Isolation von DNS wurde mit den Lösungen und Puffern des Qiagen-BloodAmpMini-Kits (Qiagen, Hilden) aus jeweils 200 μ l der entsprechenden Vollblutprobe nach Anleitung des Herstellers in den folgenden vier Schritten durchgeführt:

- (1) Lysis von 200 μ l Vollblutprobe im Lysispuffer mit Proteinase K
- (2) Adsorption der DNS von der QIAamp Membran (QIAamp Spin-Säulen)
- (3) Entfernung eventueller Verunreinigungen mittels zweier verschiedener Waschlösungen
- (4) Eluieren der an der Membran gebundenen und ausgewaschenen DNS.

2.2.3 Qualitätskontrolle der DNS mittels Agarose-Gelelektrophorese

Da die Vollblutproben von Übersee stammen, bedurfte es wegen langer Transportwege einer Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Nukleinsäuren sind auf Grund ihres Zucker-Phosphat-Rückrates bei allen pH-Werten negativ geladen (Ibelgaufs 1990). Diese Eigenschaft ist die Grundlage der verschiedenen Methoden zur Gel-Elektrophorese. Sowohl DNS- als auch RNA-Fragmente wandern in Abhängigkeit von ihrer Größe in einem elektrischen Feld stets zur Anode hin, wobei kleinere Fragmente die schnellere Geschwindigkeit aufweisen.

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) wurde standardmäßig mit einer Agarosekonzentration von 1,5 % im 5 x TBE-Puffersystem in einer horizontalen Gelkammer durchgeführt und diente der Reinheitsbestimmung isolierter DNS.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in 150 ml des entsprechenden Elektrophoresepuffers gelöst, mit 150 μ l Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach Erkalten und Verfestigung der Agarose wurden 10 μ l der entsprechenden

DNS nach Zugabe von 5 μ l Orange-G-Ladepuffer aufgetragen und die DNS in dem entsprechenden Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Spannung von 90 V für 90 bis 100 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Orientierung wurden 4 μ l 100 bp-Marker Längenstandard mit aufgetragen.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem UV-Transluminator mit einem Video-Dokumentationssystem fotografiert und ausgewertet. Die einzelnen DNS-Fragmente wurden über die Fluoreszenz anhand der Ethidiumbromid-gefärbten Banden im UV-Licht sichtbar. War die Qualität der DNS hinreichend gut, wurde diese für die Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) eingesetzt.

2.2.4 Das Prinzip der Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) war 1985 von Kary B. Mullis entwickelt worden. Sie dient der Vervielfältigung (Amplifikation) einer gewählten Sequenz von Nukleotiden, so dass von ursprünglich geringen Ausgangsmengen millionenfache Kopien entstehen. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung einzelner Reaktionsschritte, die der natürlichen Replikation ähneln. Bei jedem Reaktionszyklus wird zunächst die doppelsträngige DNS durch Erhitzen denaturiert. An die somit entstandenen einzelsträngigen DNS-Moleküle wird ein ausgewähltes Paar synthetischer Oligonukleotide (Primer) gebunden, das gegenläufig orientiert ist und den zu amplifizierenden Bereich einrahmt. Die Anlagerung der Primer erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur als die Denaturierung und ist primer-spezifisch. Sie stellt die ideale Temperatur, bei der sich der jeweilige Primer nur an einer vollständig komplementären Sequenz bindet, dar. Danach folgt die Verlängerung (Extension) der Primer am 3'OH-Ende und somit die Synthese des Gegenstranges mit Hilfe einer DNS-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs). In jedem folgenden Zyklus werden diese kontinuierlich neu synthetisierten komplementären DNS-Stränge vom Originalstrang getrennt und als neue Matrize benutzt. Während in der Monoplex-PCR pro Primerpaar nur eine DNS-Sequenz amplifiziert wird, setzt man bei der Duplex-PCR gleichzeitig zwei Primerpaare zum Nachweis zweier Genabschnitte ein. In der Multiplex-PCR werden mehrere Sequenzen simultan mit verschiedenen Primerpaaren in einem Ansatz amplifiziert.

Das Reaktionsgemisch (25 μ l) bestand aus 10 ng genomischer DNS, einer Mischung aller Primer bei 100 ng/ μ l (siehe Details unter 2.1.7 und Tabelle 4), 2,5 μ l 10x PCR-Puffer, 1 μ l (50 mM) MgCl₂, 3 μ l (2 mM) dNTP-Mix, 0,3 μ l (1 U/25 μ l) Taq Polymerase und entsprechender Menge an destilliertem Wasser.

Die Genvariation IL-10 -2744 wurde aus der Versuchsreihe der Multiplex-PCR genommen, da sie mit anderen Loci interferiert und somit zu schwache Ergebnisse reproduziert. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) gemäß dem folgenden Protokoll:

1. Denaturierungsphase: 96 °C für 5 min.
2. Denaturierungsphase: 96 °C für 30 sek.
3. Annealingphase: 62 °C für 45 sek.
4. Extensionsphase: 72 °C für 15 sek.

Die Schritte von 2. bis 4. wurden 21 Mal wiederholt. Danach erfolgte die erneute Erhitzung, die die nächste Denaturierungsphase einleitete.

5. Denaturierungsphase: 96 °C für 45 sek.
6. Annealingphase: 60 °C für 45 sek.
7. Extensionsphase: 72 °C für 25 sek.

Die Schritte von 5. bis 7. wurden 22 Mal wiederholt.

8. Extensionsphase: 72 °C für 1h.
9. Kühlphase: 10 °C.

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurden je 10 μ l jeder Reaktion auf einem 2%-Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.3).

2.2.5 Die Fragmentlängenanalyse am ABI Gene-Scan 310

Die Fragmentlängenanalyse stellt eine Variante der Elektrophorese dar, bei der die exakte Länge verschiedener DNS-Fragmente bestimmt werden kann. Man bedient sich hierbei der Hilfe von unterschiedlich farbmarkierten Primern, die sich am 5'-OH-Ende befinden.

Zur Fragmentanalyse werden unterschiedlich fluoreszierende Farbstoffe verwendet: FAM für Blau, HEX für Grün und NED für Schwarz (siehe Abb. 3). Der rote Farbstoff ROX dient als Längenstandard, der zwischen 60 bis 200 bp in 20 bp Abständen und zwischen 200 bis 400 bp in 25 bp Schritten liegt. Während der PCR lagern sich diese Primer entsprechend ihrem komplementären "template", also dem zu detektierenden Locus, an und ermöglichen so der DNS-Polymerase, den Einzelstrang zum Doppelstrang zu vervollständigen. Nach Abschluss der PCR hat man je nach Anzahl der eingesetzten Primerpaare eine entsprechende Menge an fluoreszenzmarkierten DNS-Fragmenten. Das weitere Vorgehen besteht prinzipiell aus drei aufeinanderfolgenden Schritten, nämlich der Vorbereitung der Probe für das Elektrophoresegerät, der eigentlichen Elektrophorese und der Auswertung der erhaltenen Werte mit der entsprechenden Software.

Bei der Vorbereitung für die Fragmentlängenanalyse wurden jeweils 1 μ l vom PCR-Produkt, 0,08 μ l CXR-400 Längenstandard und 14 μ l Formamid zusammenpipettiert. Das Formamid hilft bei diesem Prozess, indem es eine Wiederherstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen verhindert. Das entstandene Gemisch wurde zunächst für 5 min. bei 96°C denaturiert und danach für weitere 5 min. auf Eis gekühlt.

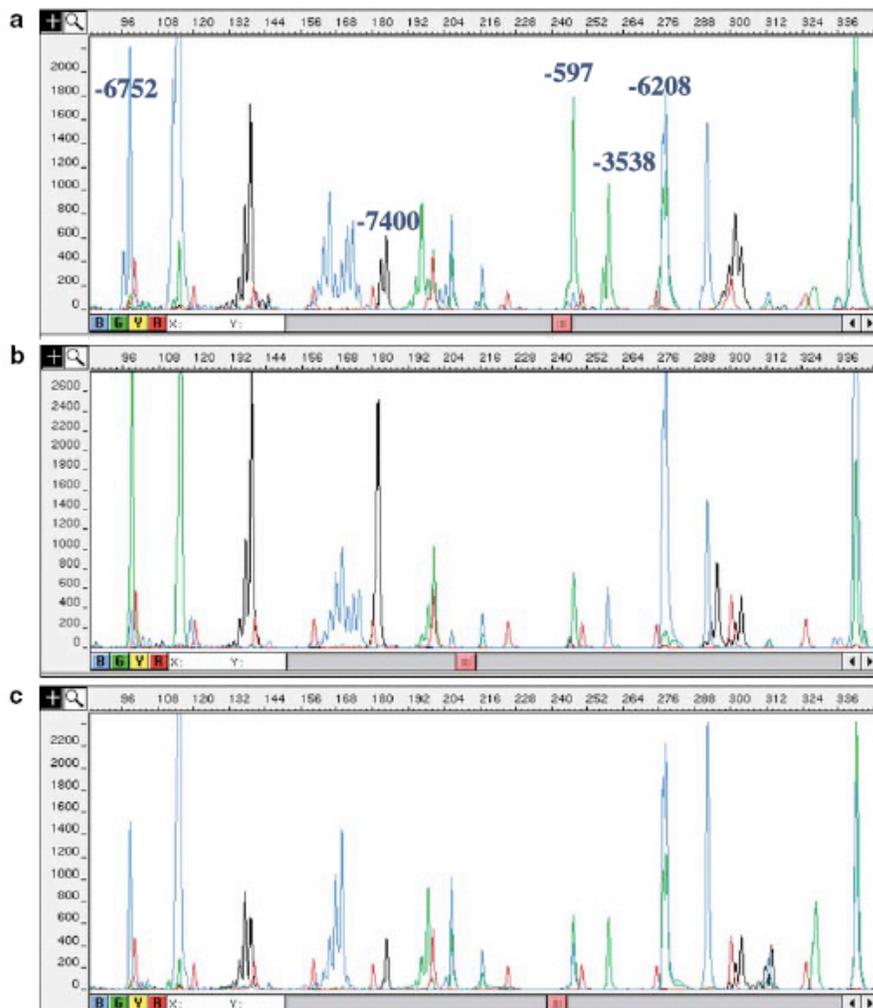
Die Fragmentlängenanalyse wurde an einem automatischen DNS-Kapillarsequenzengerät ABI Prism 310 durchgeführt. Die Messung erfolgte nach einer Injektionszeit von 5 sek. und der darauf folgenden Elektrophorese bei 60 °C in einer 47 cm langen mit POP4-Gel gefüllten Kapillare. Die Separationszeit betrug 24 min. Eine Elektrode sorgte für die zur Elektrophorese benötigte Spannung (etwa 15 kV), eine Heizplatte hielt die Temperatur während der Elektrophorese konstant bei 60 °C.

Bei dieser Gel-Elektrophorese durchlaufen die DNS-Fragmente nun die Kapillare, werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und passieren einen Laser, der Lichtwellen bestimmter Wellenlänge (488; 514.5 nm) emittiert. Treffen die Lichtwellen auf die in die DNS-Fragmente eingebauten Farbstoffe (Fluophore), werden diese zur Fluoreszenz angeregt

und beginnen Licht anderer Wellenlänge zu emittieren. Eine spezielle Kamera im DNS-Kapillarsequenziergerät ABI Prism erfasst die Wellenlängenveränderungen, wandelt sie in elektronische Signale um und erstellt so ein Elektropherogramm (siehe Abb. 3).

Die Auswertung der Fragmentlängenanalyse erfolgte in dieser Arbeit nach Herstellerangaben mit der GeneScan 310 Software. Mit dieser Software können die entsprechenden Lichtsignale graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Jeder "peak" repräsentiert ein Allel der analysierten Genorte, wobei homozygote Allele als einzelne und heterozygote Allele als doppelte "peaks" dargestellt werden.

Abb. 3: Repräsentatives Beispiel eines Elektropherogramms der Multiplex-PCR. Die blauen Spitzen stellen die FAM-markierten Primer, die grünen Spitzen die HEX-markierten Primer und die schwarzen Spitzen die NED-markierten Primer dar. Die roten Spitzen stellen den ROX-markierten Längenstandard dar.



Die Auswertung der Signale war außerdem wichtig, um die Qualität der Signale einzuschätzen, und um letztendlich die Konzentration der jeweiligen Primer anzupassen. Für die Auswertung und Analyse der dabei gewonnenen Daten wurde Microsoft Excel, JMP und GENEPOP Software (Raymond et Rousset 1995) verwendet. Die Testung für die Hardy-Weinberg-Verteilung wurde mittels GENEPOP Software durchgeführt, die eine zweistellige Allel-Codierung verwendet: A = 01, C = 02, G = 03, T = 01; für den IL-10 -7400in/del 01 = Insertion, 02 = Deletion; und für die STRs 01 für das kürzeste entdeckte Allel.

2.2.6 Die DNS-Quantifizierung mit Hilfe von Picogreen Assay

Die Methode der Quantifizierung von Doppelstrang-DNS (dsDNS) mit Hilfe von Picogreen Assay ist als Vorbereitung für die TaqMan®-PCR erforderlich. Das Verfahren beruht auf dem Fluoreszenzanstieg des Farbstoffes Picogreen nach Bindung an die DNS (Choi et Szoka 2000) und erlaubt die Quantifizierung von dsDNS mit Konzentrationen über 50 pg/ μ l mit einem Tecan Ultra Microplates Reader. Als dsDNS-Standard wurden 10 ng/ μ l menschliche genomische DNS verwendet. Die DNS-Proben sollten in einer geringeren Konzentration als 20 ng/ μ l enthalten sein. Für Messungen mit höherer Konzentration musste entsprechend verdünnt werden.

Die Reaktion wurde nach einem vorgegebenen Standardprotokoll angesetzt:

1. Jeweils 200 μ l Pico-Green-dsDNS-Reagenz, welche 400-fach in TE-Puffer verdünnt waren, wurden auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt.
2. 5 μ l der dsDNS-Standard wurden jeweils in die erste Reihe der Mikrotiterplatte zugegeben. 5 μ l der jeweiligen verdünnten dsDNS-Probe wurden in die übrigen Wells verteilt.
3. Die Platte wurde mit der mitgelieferten Folie oben abgedeckt und kurz angeschüttelt. Anschließend wurde die Platte kurz zentrifugiert.
4. Zum Schutz vor Sonnenlicht wurde die Platte mit einer Alufolie verpackt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Intensitätsabnahme der Fluoreszenz wurde dann mit Hilfe eines Teac-Ultra-Mikroplatten-Lumineszenz-Spektrometers gemessen, wobei Extinktions- bzw. Emissions-Wellenlänge bei 485 bzw. 535 nm lagen. Die Messung erfolgte automatisch. Bei Fluoreszenz-Werten außerhalb des Bereichs von 150-32000 (nm) war eine erneute Messung mit entsprechend veränderter Verdünnung der DNS-Proben nötig.

2.2.7 Die Charakterisierung von IL-1087 mittels TaqMan®-PCR

Auf Grund der besonderen Bedeutung von SNP -1087 A/G im IL-10-Gen-Promotor haben wir den SNP -1087 A/G mit der TaqMan®-PCR die NHL-Patientengruppe und die gesunde Kontrollgruppe gesondert analysiert. Der Versuch basiert auf einem Assay, der im National Cancer Institute beschrieben wird (Packer et al. 2006):

http://snp500cancer.nci.nih.gov/taqman_assays.cfm?snp_id=IL10-03&snp_type=SNP

In diesem Teil wird eine Methode der allelischen Diskriminierung unter Nutzung des ABI Prism 7900HT Sequence Detection Systems beschrieben, mit dessen Hilfe man die Entstehung des spezifischen PCR-Produkts unter Verwendung von unterschiedlich Fluoreszenz-markierten Sonden in Echtzeit verfolgen kann, die für die Zielsequenz spezifisch sind.

Die Sonden werden jeweils für jedes untersuchte Allel dem PCR-Mastermix zugesetzt. Sie sind sequenzspezifische Oligonukleotide, an der ein Fluoreszenzmarker am 5'-Ende und ein Quenching-Molekül am 3'-Ende gebunden sind. Sind diese beiden Moleküle an das Oligonukleotid gebunden, erhält man keine Fluoreszenz, da die Fluoreszenz durch das Quenching-Molekül unterdrückt wird.

In diesem Fall sind die verwendeten Fluoreszenzmarker FAM und VIC, mit denen die beiden möglichen Allele detektiert werden können. Zum Zeitpunkt des Annealings der PCR-Primer binden die Sonden spezifisch an den zu ihnen komplementären Strang der genomischen DNS zwischen dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer an. Es folgt die Amplifizierung, in der die Polymerase den zweiten DNS-Strang synthetisiert und zur gebundenen Sonde kommt. Da die Polymerase eine 5' Exo-Nuklease-Aktivität besitzt, wird die Sonde abgebaut.

Der Fluoreszenzmarker wird also während der PCR-Reaktion von der Sonde getrennt und dieser emittiert somit eine Fluoreszenz mit einer definierten Wellenlänge. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zu der Zahl des entstandenen spezifischen PCR-Produkts. Zugleich wird das Fluoreszenzsignal durch die transparente Wand des Reaktionsgefäßes oder durch den Deckel über einen Laser automatisch gemessen und direkt aufgezeichnet.

Der Zeitpunkt der Messung im Zyklus ist unabhängig, da ein einmal abgebauter Reporterfarbstoff permanent fluoresziert. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität hängt auch von der Zahl der Anfangskopien der genomischen DNS ab. Je mehr Kopien vorhanden sind, desto früher ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Dadurch wird eine quantitative Bestimmung der Kopienzahl der genomischen DNS in der Probe ermöglicht.

Der Reaktionsansatz für die TaqMan®-PCR bestand für eine Probe zuletzt aus folgenden Reagenzien:

<u>Reagenzien</u>	<u>Ausgangskonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Probenmenge</u>
2-fach konzentrierter TagMan-Mix	2-fach		2,5 μ l
Primer IL10RealF1087AG	22,5 μ mol/l	900 nmol/l	0,2 μ l
Primer IL10RealR1087AG	22,5 μ mol/l	900 nmol/l	0,2 μ l
Sonde IL10_1087_G	5 μ mol/l	200 nmol/l	0,2 μ l
Sonde IL10_1087_A	5 μ mol/l	200 nmol/l	0,2 μ l
Wasser			0,7 μ l

Die Reagenzien wurden in einem dünnwandigen 1,5 ml PCR-Reaktionsgefäß vermischt und jeweils 4 μ l vom Reaktionsansatz mit einer 8-Kanalpipette in eine 384-Well-Platte verteilt. In jedes Well wurden je 1 μ l der jeweiligen DNS-Probe (10 ng/ μ l) pipettiert. Zur Gegenprobe wurden Leerproben mit destilliertem Wasser in den Versuchen mit einbezogen. Anschließend wurde die 384-Well-Platte mit einer Folie verschlossen.

Die Amplifizierung der spezifischen DNS-Fragmente wurde in einem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System entsprechend nachfolgendem Protokoll ausgeführt:

1. Initialphase: 50 °C für 2 min.
2. Denaturierungsphase: 95 °C für 10 min.
3. Denaturierungsphase: 92 °C für 30 sek.
4. Annealingphase: 60 °C für 1 min.

Die Schritte von 3. bis 4. wurden 49 Mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben mit der SDS Software.

2.2.8 Auswertung der Fragmentlängenanalyse

Die gewonnenen genetischen Daten wurden mit der GENEPOP Software analysiert (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>). Unsere Analyse beinhaltete die Testung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die genotypische und allelische Differenzierung zwischen den beschriebenen Kohorten sowie den direkten Vergleich zwischen den erwarteten Daten mit den beobachteten homozygoten und heterozygoten Individuen. Die haplotypische Analyse wurde mit der Arlequin Software und der MDC Software durchgeführt (<http://lgb.unige.ch/arlequin/> und <http://www.bioinf.mdc-berlin.de/projects/hap/>). Die Variablen bezüglich der Grad-Einteilungen nach WHO für die Leukozytopenie und Infektion sowie die genetischen, genotypischen und allelischen Differenzierungen zwischen den Kohorten wurden mit Hilfe des χ^2 -Tests (Chi-Quadrat-Test), falls nötig mittels Fisher's exaktem Test untersucht. Diese Tests wurden angewendet, um Unterschiede der untersuchten Merkmale zwischen den Kohorten zu analysieren.

2.2.9 Die Statistische Analyse

Die Statistische Analyse wurde für das Anfangskollektiv von 425 NHL-Patienten zunächst gemeinsam mit Frau Dr. rer. nat. Bettina Kulle (Postdoc in der Abteilung für Biostatistik, Institut für Medizinische Grundlagenforschung, Universität Oslo) durchgeführt. Die vollständige statistisch-epidemiologische Analyse des Gesamtkollektivs von 500 Patienten wurde von Frau Samira Zeynalova und Frau Marita Klöss (Diplom-Mathematikerinnen, Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie, Universität Leipzig) durchgeführt.

Für die Analyse der Versuchsdaten wurde die Software "Statistical Analysis System" (SAS) Version 6.12 (SAS Institute, Cary, North Carolina) benutzt.

Die Verteilungen für die Gesamtüberlebensrate (OS) sowie das ereignisfreie Intervall (EFS) wurde mit der Kaplan Meier Kurve abgeschätzt und mit dem "log-rank"-Test verglichen.

Mit Hilfe des Freidlin-Tests wurde nach genobasierten Assoziationen unter den SNP getestet und anschließend mit Fishers exaktem Test die Signifikanz der Genotypenkombinationen geprüft. Ebenfalls wurde von Frau Dr. rer. nat. Bettina Kulle eine Adjustierung mit Bonferroni oder "False Discovery Rate"-Methode (FDR-Methode) von Benjamini und Hochberg durchgeführt.

Die Haplotypen wurden mit dem PHASE-Programm unter Berücksichtigung der vorhandenen Lokalisationen berechnet, ebenso ein Permutationstest auf einen Unterschied der Haplotypenfrequenz zwischen B-NHL-Patienten und der Kontrollgruppe.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von IL-10-Genvariationen an drei verschiedenen ethnischen Kohorten

3.1.1 Genotypischer Vergleich der drei verschiedenen ethnischen Kohorten

In Tabelle 9 werden die untersuchte vietnamesische, europäische und afrikanische Kohorte genotypisch miteinander verglichen. Die Daten entstanden aus der Fragmentlängenanalyse und deren statistischen Auswertung der Genvariationen IL-10 -597 A/C, -1087 A/G, -3538 A/T, -6208 C/G, -6752 A/T, -7400 in/del. Diese aufgelisteten Genvariationen aller drei Kohorten standen alle im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die SNP -5402 und -1354 wurden aus der weiteren Analyse genommen, weil sie bei der Überprüfung nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht standen. Diese Daten werden daher nicht aufgeführt. Des Weiteren wurde der SNP -824 wegen des schlecht auswertbaren Signals in der Fragmentlängenanalyse nicht weiter untersucht.

In der Tabelle 9 wird gezeigt, dass sich im proximalen Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens in der asiatischen Kohorte der Genotyp -1087 AA als der absolut dominante Genotyp (89%) herausstellte. Dagegen trat dieser Genotyp in der europäischen und afrikanischen Kohorte zu 29% auf. In diesen beiden Kohorten war dagegen der heterozygote Genotyp -1087 AG am weitesten verbreitet (47% bzw. 49%) (siehe Tab. 9).

In der asiatischen Kohorte war der proximale homozygote Genotyp -597 AA am häufigsten vertreten (52%), während in der europäischen und afrikanischen Kohorte der homozygote Genotyp -597 CC bzw. -597 AC (55% bzw. 54%) häufiger war (siehe Tab. 9).

Im mittleren Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens war in der asiatischen Kohorte der Genotyp -3538 TT der absolut dominante Genotyp (96%), während der Genotyp -3538 AA in der asiatischen Kohorte überhaupt nicht auftrat. In der europäischen Kohorte war dagegen der Genotyp -3538 AT (52%), in der afrikanischen Kohorte der Genotyp -3538 TT (52%) am häufigsten vertreten (siehe Tab. 9).

Im proximalen Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens waren in der asiatischen Kohorte fast ausschließlich die Genotypen -6208 GG (90%) und -6752 AA (92%) vorhanden. Dagegen war die genotypische Verteilung des proximalen Bereichs in der europäischen und

afrikanischen Kohorte ausgeglichener. Während in der europäischen Kohorte vorwiegend die Genotypen -6208 CG (48%) und -6752 AT (49%) auftraten, waren in der afrikanischen Kohorte die Genotypen -6208 CG (42%) und -6752 AA (53%) am häufigsten vertreten. Die homozygote Insertion bei -7400 war in allen drei Kohorten dominant (siehe Tab. 9).

In der statistischen Auswertung unterschieden sich alle drei Kohorten im genotypischen Vergleich jeder einzelnen Genvariation IL-10 -597 A/C, -3538 A/T, -6752 A/T, -7400 in/del signifikant voneinander ($P \leq 0.05$ für die jeweils genannten Genvariationen). Dagegen hatten die Genvariationen -6208 C/G und -1087 A/G in der europäischen und afrikanischen Kohorte ähnliche allelische und genotypische Verteilungsmuster ($P = 0,736$ bzw. $P = 0,775$). Nach Berechnung mit Fisher's Methode hatten die europäische und afrikanische Kohorte im direkten Vergleich ähnliche Verteilungsmuster für die Häufigkeit des Auftretens der untersuchten Genvariationen ($\text{Chi}^2 = 0,569$), während die europäische und afrikanische Kohorte sich jeweils von der vietnamesischen signifikant unterschieden.

Die Analyse des genotypischen Kopplungsungleichgewichts ergab für die asiatische Kohorte ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den Genvariationen IL-10 -7400 in/del und -3538 A/T bzw. -7400 in/del und -597 A/C ($p = 0.084$ bzw. $p = 0.276$) und für die afrikanische ein Kopplungsungleichgewicht zwischen der Genvariation IL-10 -7400 in/del und 597 ($p = 0.301$).

Tab. 9: Genotypischer Vergleich der vietnamesischen, europäischen und afrikanischen Kohorte für die Genvariationen IL-10 -597 A/C, -1087 A/G, -3538 A/T, -6208 C/G, -6752 A/T, -7400 in/del (Insertion = 01, Deletion = 02) nach Probanden in Prozent.

SNP	Vietnamesische Kohorte (n = 143)			Europäische Kohorte (n = 209)			Afrikanische Kohorte (n = 127)		
	-597	AA 52,4%	AC 42,7%	CC 4,9%	AA 4,9%	AC 40,1%	CC 55%	AA 10,5%	AC 53,5%
-1087	AA 88,6%	AG 10,7%	GG 0,7%	AA 28,5%	AG 46,6%	GG 24,9%	AA 28,8%	AG 49,3%	GG 21,9%
-3538	AA 0	AT 4,2%	TT 95,8%	AA 14%	AT 52,3%	TT 33,7%	AA 7,9%	AT 40,3%	TT 51,8%
-6208	CC 0	CG 9,8%	GG 90,2%	CC 19,8%	CG 47,9%	GG 32,3%	CC 21,3%	CG 41,9%	GG 36,8%
-6752	AA 92,2%	AT 7,8%	TT 0	AA 37,6%	AT 48,7%	TT 13,7%	AA 53,4%	AT 35,6%	TT 11%
-7400	0101 98,6%	0102 1,4%	0202 0	0101 59,6%	0102 32,8%	0202 7,6%	0101 82,3%	0102 14,3%	0202 3,4%

3.1.2 Der distale und mediale Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens

In den Tabellen 10, 11 und 12 werden die Frequenzen der distalen und medialen Haplotypen der untersuchten SNP zwischen der vietnamesischen, europäischen und afrikanischen Kohorte verglichen. Die Daten entstanden aus der Fragmentlängenanalyse und deren haplotypischen Analyse der oben genannten Genvariationen.

Tabelle 10 zeigt die Frequenzen der distalen Haplotypen der SNP -6754 A/T und -6208 C/G der 5' flankierenden Region im IL-10-Gen. In der asiatischen Kohorte war der dominante Haplotyp AG mit einer Frequenz von 95,1% vertreten. Im Gegensatz dazu fand man in der europäischen Kohorte drei häufig vorkommende Haplotypen: AG, TC, AC mit den jeweiligen Frequenzen 55%, 36,1% und 7,5%. Der Haplotyp TG wurde selten beobachtet. In der afrikanischen Kohorte zeigten die SNP -6752 A/T und -6208 C/G ein ähnliches

haplotypisches Verhalten wie in der europäischen Kohorte. Die drei häufig vorkommenden Haplotypen waren TC (26,6%), AG (55,4%) und AC (15,9%) (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Die Frequenzen der distalen Haplotypen der SNP -6754 A/T und -6208 C/G der 5' flankierenden Region im IL-10-Gen. „n“ ist die Anzahl der untersuchten Individuen.

SNP	Haplotypen	Vietnamesische Kohorte (n =143)	Europäische Kohorte (n = 191)	Afrikanische Kohorte (n = 123)
-6752/ -6208	A-G	0.951	0.550	0.554
	T-C	0.039	0.361	0.266
	A-C	0.011	0.075	0.159
	T-G	0	0.015	0.021

Unter Berücksichtigung des SNP -7400 in/del konnte die Zahl der häufig vorkommenden distalen Haplotypen für die europäische und afrikanische Kohorte erweitert werden, während sich die haplotypische Verteilung der vietnamesischen Kohorte auf drei Haplotypen begrenzte (siehe Tab. 11).

In der vietnamesischen Kohorte war vorwiegend der Haplotyp InAG verbreitet (95%). In der europäischen Kohorte waren vorwiegend die Haplotypen InAG (53%), DeTC (20,5%) und InTC (16%) vertreten. In der afrikanischen Kohorte kamen die Haplotypen InAG und InTC ähnlich häufig vor (53,5% bzw. 17,9%). Im Gegensatz zur europäischen Kohorte kam der Haplotyp InAC mit 15,6% unter den drei häufigsten Haplotypen in dieser Betrachtung vor (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Die Frequenzen der distalen Haplotypen der SNP -7400 in/del, -6752 A/T und -6208 C/G der 5' flankierenden Region im IL-10-Gen. „n“ ist die Anzahl der untersuchten Individuen.

SNP	Haplotypen	Vietnamesische Kohorte (n = 143)	Europäische Kohorte (n = 191)	Afrikanische Kohorte (n = 123)
-7400/ -6752/ -6208	In-A-G	0.950	0.530	0.535
	In-T-C	0.032	0.160	0.179
	De-A-C	0.011	0.012	0
	In-T-G	0	0.012	0.021
	In-A-C	0	0.063	0.156
	De-T-C	0	0.205	0.085
	De-A-G	0	0.018	0.020

Bei der gemeinsamen Betrachtung der distalen SNP -7400 in/del, -6752 A/T und -6208 C/G und dem medialen SNP -3538 A/T konnte die Zahl der häufig vorkommenden Haplotyp-Kombinationen in allen drei Kohorten erweitert werden. Auch hier verhielten sich die europäische und afrikanische haplotypische Verteilung annähernd ähnlich und hatten ein variables Muster an Haplotypen als die vietnamesische Kohorte (siehe Tab. 12).

In der asiatischen Kohorte war vorwiegend der Haplotyp InAGT mit 95,1% am häufigsten vertreten. In der europäischen Kohorte zeigten häufig die Haplotyp-Kombinationen InAGT mit 53,1%, DeTCA mit 20,4% und InTCA mit 14,2%. DeACT, InACA und InTCT traten seltener auf (4%, 2,3% bzw. 1,5%). In der afrikanischen Kohorte traten die Haplotypen InAGT mit 52%, InTCA mit 17,4% und InACT bzw. DeACT mit 14,7% bzw. 15% am häufigsten auf. Die Haplotypen DeTCA, InACA, DeAGT und InTGT waren dagegen selten vorzufinden (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Die Frequenzen der Haplotypen der SNP -7400 in/del, -6752 A/T, -6208 C/G und -3538 A/T der distal-medialen 5' flankierenden Region im IL-10-Gen. „n“ ist die Anzahl der untersuchten Individuen.

SNP	Haplotypen	Vietnamesische Kohorte (n = 143)	Europäische Kohorte (n = 191)	Afrikanische Kohorte (n = 123)
-7400/ -6752/ -6208/ -3538	In-A-G-T	0.951	0.531	0.520
	In-T-C-A	0.018	0.142	0.174
	De-A-C-T	0.011	0.040	0.150
	In-A-C-A	0	0.023	0.016
	In-T-C-T	0.014	0.015	0
	In-A-G-A	0	0	0.012
	In-T-G-A	0	0.011	0
	In-T-G-T	0	0	0.022
	In-A-C-T	0	0.040	0.147
	De-T-C-A	0	0.204	0.086
	De-A-C-A	0	0.012	0
	De-A-G-T	0	0	0.020

3.1.3 Erweiterte SNP-Haplotypen der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens in verschiedenen ethnischen Gruppen

Die Abbildung 5 zeigt den Vergleich der Frequenzen der erweiterten Haplotypen größer 1% der SNP -7400, -6752, -6208, -3538, -1087 und -597 der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens in drei verschiedenen untersuchten Kohorten. Die Daten entstanden aus der Fragmentlängenanalyse und deren haplotypischen Analyse der oben genannten Genvariationen.

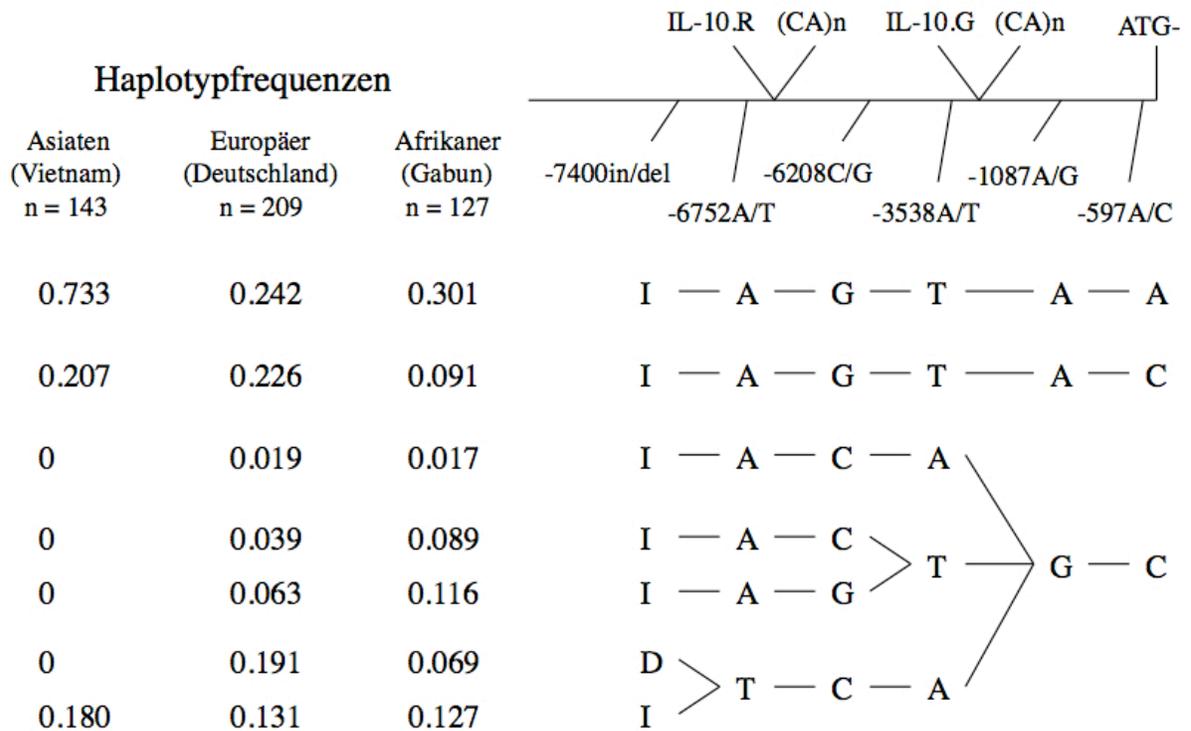
Die Analyse der haplotypischen Verteilung der oben genannten SNP in allen drei Kohorten ergab grundsätzlich unterschiedliche Frequenzen in der haplotypischen Verteilung.

Die asiatische Kohorte zeigte dabei eine geringere genetische Variabilität im Vergleich zur afrikanischen und europäischen Kohorte. Von den insgesamt 16 aufgetretenen Haplotypenkombinationen, die mit mehr als einem Prozent auftraten, zeigten sich nur fünf verschiedene Haplotypen in der asiatischen Kohorte, während bei der afrikanischen Kohorte und in der kaukasischen Kohorte jeweils elf verschiedene Haplotypen gefunden wurden (siehe Abb. 5).

In allen drei Kohorten trat vorwiegend der Haplotyp IAGTAA mit hohen Frequenzen auf (Asiaten: 73,3%, Europäer: 24,2% und Afrikaner: 30,1%). Während in der asiatischen Kohorte vorwiegend nur die Haplotypen IAGTAA (73,3%), IAGTAC (20,7%) und ITCAGC (18%) auftraten, zeigte sich der erweiterte Haplotyp in der afrikanischen und europäischen Kohorte variabler. Hier traten in beiden Kohorten vorwiegend die Haplotypen IAGTAA, IAGTAC, DTCAGC und ITCAGC auf (siehe Abb. 5).

Zudem ist der proximale Haplotyp GC (SNP -1087 und -597), der zusammen mit dem medialen SNP -3538 die proximal-medialen Haplotypen TGC und AGC bildet, im Vergleich zu den anderen proximal-medialen Haplotypen TAA und TAC zu einem hohen Grad mit verschiedenen distalen Haplotypen verbunden (siehe Abb. 5). In der europäischen und afrikanischen Kohorte war vorwiegend der proximal-mediale Haplotyp AGC vertreten, während in der asiatischen Kohorte fast ausschließlich der proximal-mediale Haplotyp TAA auftrat.

Abb. 5: Vergleich der Haplotypenfrequenzen (> 1%) der SNP -7400, -6752, -6208, -3538, -1087 und -597 der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens in drei verschiedenen geographischen Regionen. „n“ ist die Anzahl der untersuchten Individuen, D = Deletion, I = Insertion.



3.2 IL-10-Polymorphismus bei Patienten mit aggressivem NHL im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

3.2.1 Die allelische und genotypische Verteilung bei Patienten mit aggressivem NHL und der gesunden Kontrollgruppe

Aufbauend auf den Ergebnissen in 3.1. und deren Versuchsaufbau wurde eine Gruppe von 500 Patienten mit NHL aus der NHL-B1/B2-Studie der "Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome" (German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group, DSHNHL) genotypisiert und danach genotypisch und haplotypisch analysiert. Im zweiten Schritt wurde die untersuchte Patientengruppe mit einer entsprechenden gesunden Kontrollgruppe (n = 236) verglichen.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Analyse der Allelfrequenzen und die genotypische Verteilung der untersuchten Patientengruppe mit aggressivem NHL (n = 500) und der gesunden Kontrollgruppe (n = 236) dargestellt. Aus der Tabelle 13 geht hervor, dass IL-10 - 7400 Del/Del in der Patientengruppe (3%) weniger vertreten ist als in der gesunden Kontrollgruppe (6%). Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant ($p_{\text{Chi } 22 \text{ vs. } 12 + 11} = 0.110$).

Die Analysen ergaben, dass die Patientengruppe und die gesunde Kontrollgruppe sich genotypisch nicht voneinander unterscheiden. Der Hardy-Weinberg-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede in den beiden untersuchten Gruppen in der Anzahl der homo- und heterozygoten Genotypen für die analysierten IL-10-Genvariationen.

Tab. 13: Die genotypische Verteilung und Allel-Frequenzen der IL-10-Polymorphismen -7400 in/del, -6752 A/T, -6208 C/G, -3538 A/T, -1087 A/G und -597 A/C bei Patienten mit aggressivem NHL (n = 500) und der gesunden Kontrollgruppe (n = 236) (Quelle: Kube et al. 2008, 14 (12): 3777-84)

Genotypen	Kontroll-Gruppe	NHL-B-Patienten	Minor Genotyp	P
-7400 in/del				
Ins Ins	150 (64%)	305 (61%)		0.995 *
Ins Del	72 (31%)	178 (36%)	Del Del	0.110 □
Del Del	14 (6%)	17 (3%)		0.505 †
-6752 A/T				
A A	91 (39%)	176 (35%)		0.399 *
A T	113 (48%)	250 (50%)	T T	0.655 □
T T	32 (14%)	76 (15%)		0.376 †
-6208 C/G				
C C	44 (19%)	80 (16%)		0.928 *
C G	110 (47%)	262 (52%)	C C	0.371 □
G G	82 (35%)	158 (32%)		0.395 †
-3538 A/T				
A A	33 (14%)	74 (15%)		0.962 *
A T	122 (52%)	249 (50%)	A A	0.769 □
T T	81 (34%)	177 (35%)		0.775 †
-1087 A/G				
A A	67 (28%)	134 (27%)		0.766 *
A G	108 (46%)	253 (51%)	G G	0.333 □
G G	61 (26%)	113 (23%)		0.651 †
-597 A/C				
A A	14 (6%)	26 (5%)		0.436 *
A C	98 (42%)	196 (39%)	A A	0.683 □
C C	124 (53%)	178 (56%)		0.437 †

Abkürzungen:

* : Jeweiliger p-Wert beim allelbasierten Vergleich

□ : p-Wert beim Vergleich Minor-Genotyp vs. heterozygoten Genotyp und den Major-Genotyp

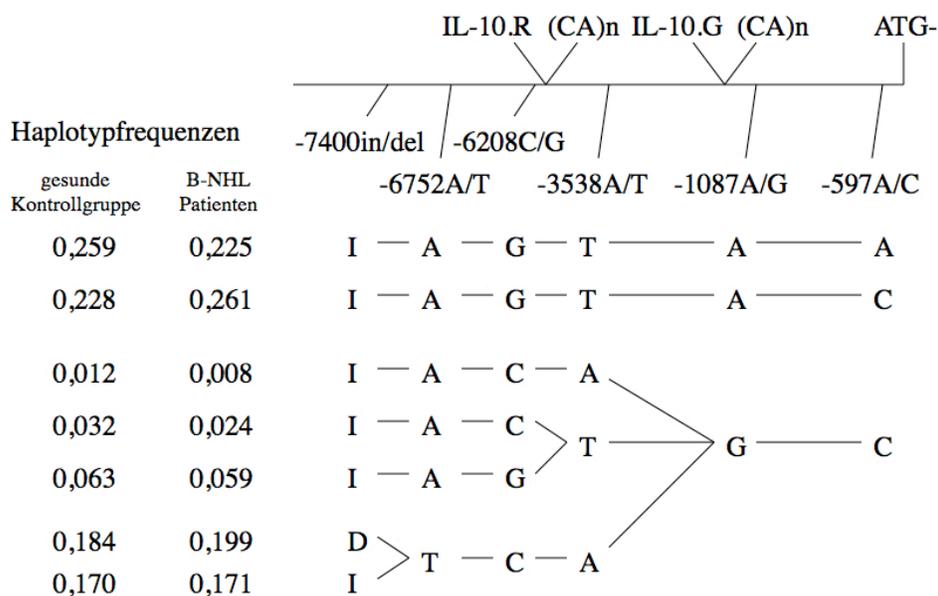
† : p-Wert beim Vergleich Major-Genotyp vs. heterozygoten Genotyp und den Minor-Genotyp

3.2.2 Die haplotypische Verteilung bei Patienten mit aggressivem NHL und der gesunden Kontrollgruppe

Basierend auf den genotypischen Daten in Tabelle 13 sind in der Abbildung 6 die Haplotypen der IL-10 5' flankierenden Region mit einer geschätzten Frequenz von über 3% für die Genvariationen -7400 in/del, -6752 A/T, -6208 C/G, -3538 A/T, -1087 A/G und -597 A/C der Patienten mit aggressivem NHL im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe dargestellt. Die haplotypische Schätzung wurde sowohl für die Patientengruppe als auch für die gesunde Kontrollgruppe durchgeführt.

Die vier Haplotypen IAGTAA, IAGTAC, ITCAGC und DTCAGC traten am häufigsten auf. Der Locus IL-10 -7400 Del schien ausschließlich mit dem Locus IL-10 -1087G verbunden zu sein (siehe Abb. 6). Die statistische Analyse ergab, dass sich die Patientengruppe und die gesunde Kontrollgruppe im haplotypischen Vergleich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Abb. 6: Die haplotypische Verteilung der IL-10 5' flankierenden Region für die untersuchten Genvariationen bei den Patienten mit aggressivem NHL und der gesunden Kontrollgruppe. Die untersuchten Genvariationen stehen in der Abbildung in Relation zu den Promotor-Mikrosatelliten IL-10.R, IL-10.G und ATG des IL-10-Gens, die in der Arbeit von Mörmann et al. (2004) beschrieben sind.



3.2.3 IL-10-Polymorphismus in Zusammenhang mit dem Verlauf des aggressiven NHL

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden die gewonnenen Daten mit den klinischen Daten der NHL-B1/B2-Studie (Pfreundschuh et al. 2004 a, Pfreundschuh et al. 2004 b) verglichen. Basierend auf einer univariaten Analyse wird in der Tabelle 14 das Gesamtüberleben (OS) und das ereignisfreie Überleben (EFS) von 500 Patienten mit aggressivem NHL in Abhängigkeit der untersuchten IL-10-Genvariationen gegenübergestellt. Die Abbildung 7A zeigt das kumulative Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Genotyp für den SNP IL-10 -7400.

Tabelle 14 zeigt, dass die Träger des Genotyps IL-10 -7400 DelDel ein signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben hatten und unterschieden sich erheblich im Vergleich zu den Trägern des Genotyps IL-10 -7400 InIn und -7400 InDel (73.4%, KI von 95% [69%; 78%], $P = 0.004$) (siehe Tab. 14).

Lediglich 43.4% der Patienten, die Träger des Genotyps IL-10 -7400 DelDel waren, hatten nach drei Jahren überlebt (bei einem Konfidenzintervall (KI) von 95% [19%; 68%]) (Abb. 7A).

Dagegen überlebten in diesem Zeitintervall 72.3% bzw. 75.3% der Patienten, die Träger des Genotyps IL-10 -7400 InIn und -7400 InDel waren ($P = 0.009$) (siehe Tab. 14 und Abb. 7A). Abbildung 7B stellt das kumulative Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit aggressivem NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-10 -6752 dar. Hier fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate nach drei Jahren bei den Trägern des Genotyps IL-10 -6752 TT im Vergleich zu den Trägern des IL-10 -6752 AT und -6752 AA (siehe Tab. 14 und Abb. 7B).

Die Träger des Genotyps IL-10 -6752 TT hatten eine kürzere Überlebensrate von 64.6% nach drei Jahren (KI von 95% [53%; 76%]). Dagegen überlebten 73.7% der Träger des IL-10 -6752 AT und -6752 AA (KI von 95% [69%; 77%]) ($P = 0.051$) (siehe Tab. 14 und Abb. 7B).

Für die anderen Genvariationen IL-10 -6208 CG, IL-10 -3538 AT, IL-10 -1087 AG und IL-10 -597 AC konnte man kein signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben finden (siehe Tab. 12). Die Analyse nach dem ereignisfreien Überleben zeigte ebenfalls keinen eindeutigen signifikanten Unterschied für alle untersuchten Genvariationen (siehe Tab. 14). Die Träger der

Genotypen IL-10 -7400 DelDel und IL-10 -6752 TT zeigten lediglich einen Trend zu einem signifikant kürzeren ereignisfreien Überleben (0.091 bzw. 0.063).

Eine haplotypische Analyse ergab, dass 16 von 17 Patienten mit dem Haplotyp DelTCAGC (SNP -7400, -6752, -6208, -3538, -1087, -597) zugleich Träger des Genotyps IL-10 -7400 DelDel und des Genotyps IL-10 – 6752 TT sind.

Auf Grund der möglichen Besonderheit des Haplotyps TCA (der IL-10-Genvariationen -6752, -6808, -3538) wurde das Gesamtüberleben (OS) und das ereignisfreie Überleben (EFS) der Patientengruppe mit den Trägern des homozygoten Haplotyps TCA und den Trägern aller anderen Genotypen verglichen (siehe Abb. 8A und 8B).

Die Abbildungen 8A und 8B zeigen, dass sich die Träger des homozygoten Haplotyps TCA von den anderen Genotypen signifikant im ereignisfreien Überleben (EFS) ($P = 0.047$) und grenzwertig signifikant im Gesamtüberleben (OS) ($P = 0.064$) unterscheiden.

Tab. 14 : Gesamtüberleben (OS) und ereignisfreies Überleben (EFS) von Patienten mit aggressivem NHL in Abhängigkeit der untersuchten IL-10-Genvariationen der 5' flankierenden Region. Signifikante P-Werte sind fett gedruckt.

Genotyp	3 Jahre Überlebensrate		P-Wert	
	OS	EFS	OS	EFS
-7400				
InIn n = 305	72.3	59.1		
InDel n = 178	75.3	62.5	0.009	0.190
InIn; InDel	73.4	60.4		
DelDel n = 17	43.4	39.2	0.004	0.091
-6752				
AA n = 176	72.8	60.3		
AT n = 250	74.4	61.2	0.143	0.166
AA; TT	73.7	60.8		
TT n = 74	64.6	53.2	0.051	0.064
-6208				
CC n = 80	68.8	59.4		
CG n = 262	74.4	59.9	0.448	0.768
CC; CG	73.1	59.8		
GG n = 158	70.9	59.6	0.556	0.956
-3538				
AA n = 74	66.3	56.2		
AT n = 249	75.2	61.4	0.172	0.217
AA; AT	73.5	60.2		
TT n = 177	66.3	58.7	0.116	0.665
-1087				
AA n = 134	71.7	60.6		
AG n = 253	74.2	59.8	0.788	0.936
AA; AG	73.4	60.1		
GG n = 113	69.1	58.5	0.553	0.733
-597				
AA n = 26	71.6	52.4		
AC n = 196	72.7	59.5	0.666	0.778
AA; AC	72.6	58.7		
CC n = 278	72.2	60.5	0.862	0.912

Abb. 7A: Kaplan-Meier-Kurven für das kumulative Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit aggressivem NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-10 -7400. Kaplan-Meier-Kurven stellen Überlebenskurven dar, die kumulierte Überlebensraten bei retrospektiven Studien schätzen. Die Träger des Genotyps IL-10 -7400 DelDel hatten ein signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben und somit eine schlechtere Prognose als die anderen beiden Genotypen. Der P-Wert spiegelt das Ergebnis des log-rank Test wider.

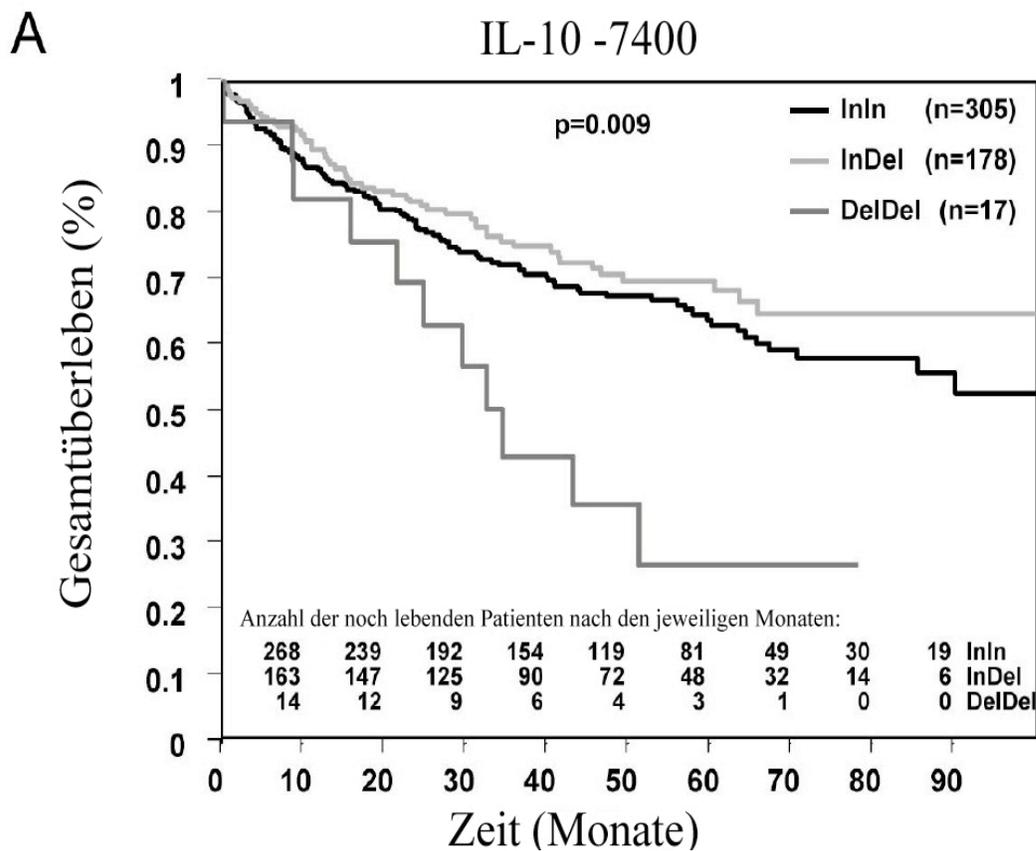


Abb. 7B: Kaplan-Meier-Kurven für das kumulative Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit aggressivem NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-10 -6752. Die Träger des Genotyps IL-10 -6752 TT hatten ein grenzwertig signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben. Der P-Wert spiegelt das Ergebnis des log-rank-Tests wider.

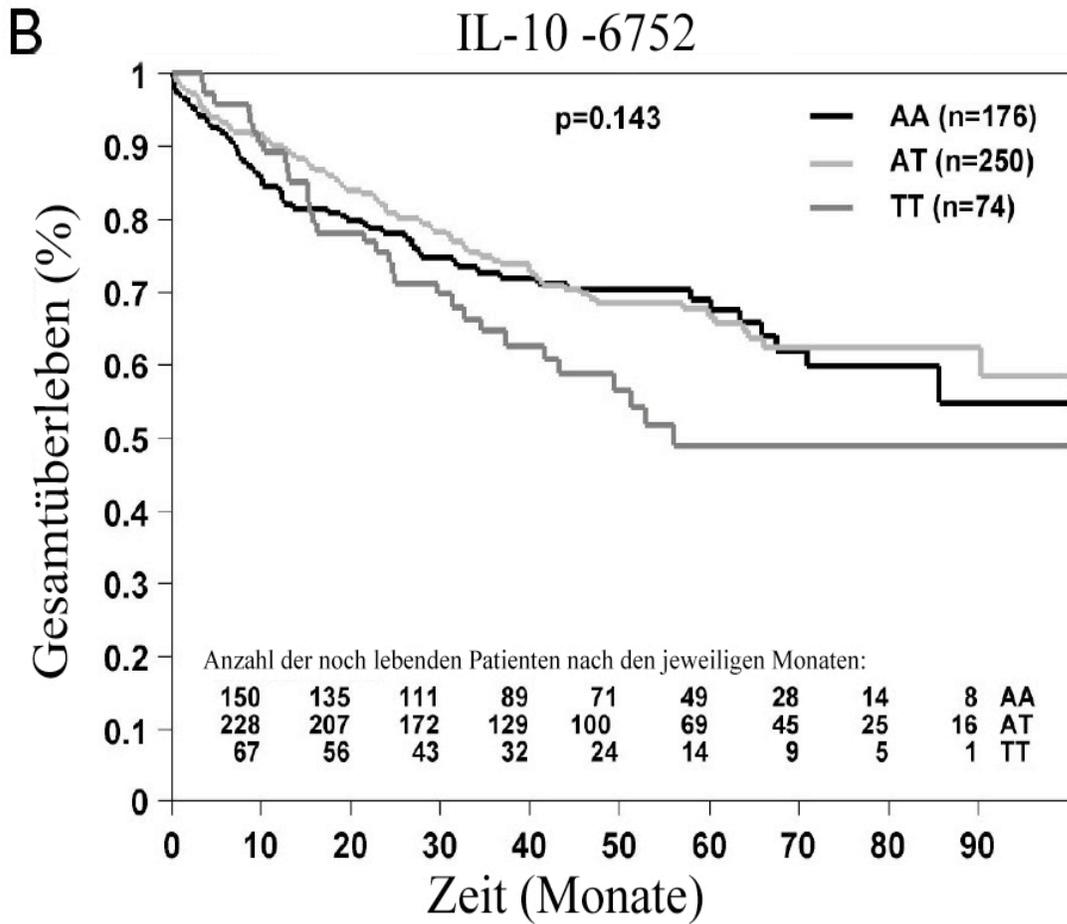


Abb. 8A: Kaplan-Meier-Kurven für das kumulative Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit aggressivem NHL im haplotypischen Vergleich zwischen dem homozygoten Haplotyp TCA/TCA (IL-10 -6752TT, -6208CC, -3538AA) und den anderen Haplotypen. Die Träger des homozygoten Haplotyps TCA/TCA hatten ein grenzwertig signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben und eine schlechtere Prognose als die anderen Haplotypen. Der P-Wert spiegelt das Ergebnis des log-rank-Tests wider.

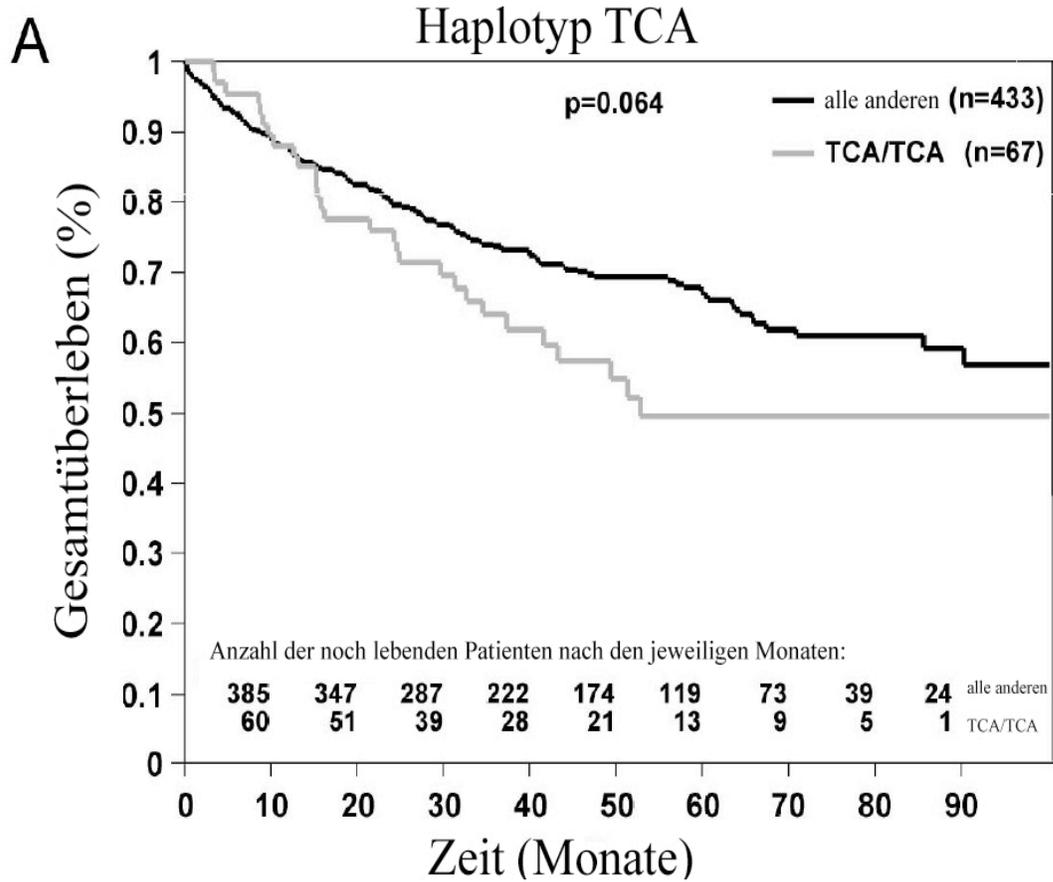
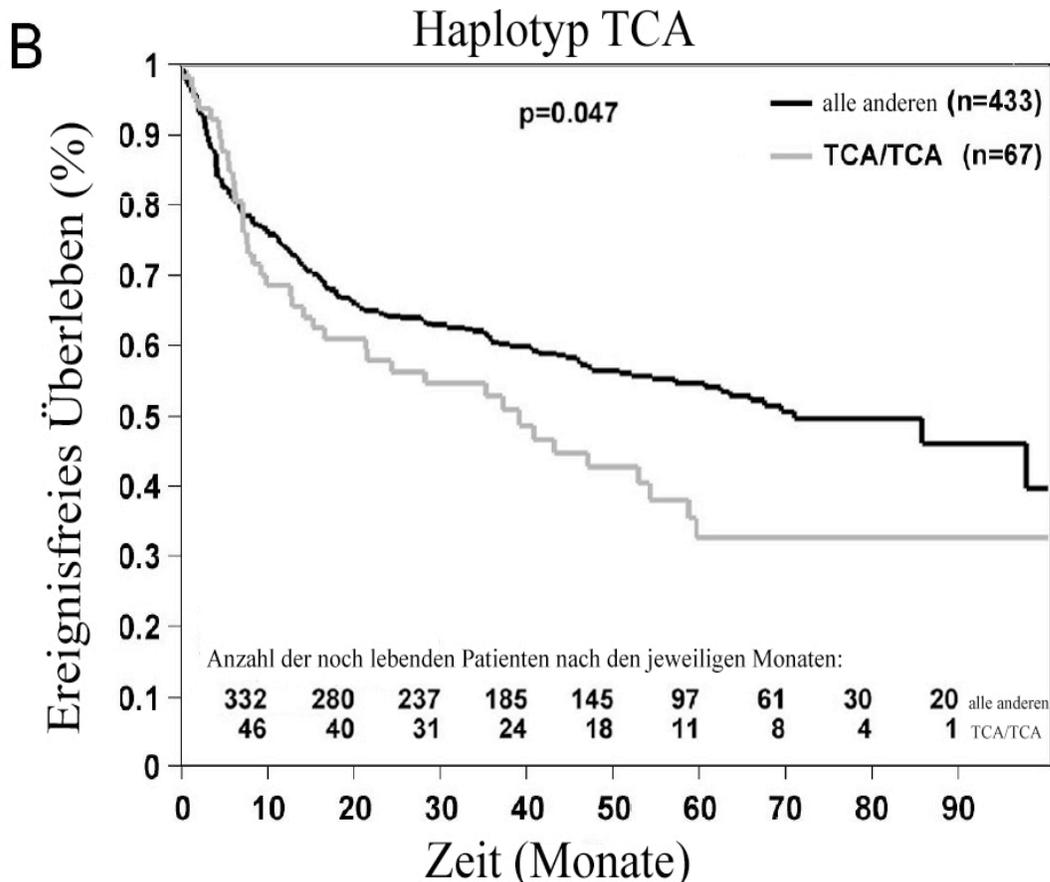


Abb. 8B: Kaplan-Meier-Kurven für das kumulative ereignisfreie Überleben (EFS) von Patienten mit aggressivem NHL im haplotypischen Vergleich zwischen dem homozygoten Haplotyp TCA/TCA (IL-10 -6752TT, -6208CC, -3538AA) und den anderen Haplotypen. Die Träger des homozygoten Haplotyps TCA/TCA hatten ein signifikant kürzeres kumulatives ereignisfreies Überleben und eine schlechtere Prognose als die anderen Haplotypen. Der P-Wert spiegelt das Ergebnis des log-rank-Tests wider.



In einer multivariaten Analyse wurde der Einfluß der Genotypvariationen auf die klinischen Parameter nach Anpassung der fünf IPI-Risikofaktoren (ein erhöhter LDH Laborwert vor der Behandlung, ECOG > 1, extranodale Beteiligung > 1, ein fortgeschrittenes Stadium III oder IV und ein Alter > 60) untersucht. Es zeigte sich lediglich beim Genotyp IL-10 -7400 Del/Del im Vergleich zu den Genotypen IL-10 -7400Ins/Ins und IL-10 -7400Ins/Del ein Trend zum erhöhten Risiko (relatives Risiko 1.9) und ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben (P = 0.037) (siehe Tab. 15). Für die anderen untersuchten Genvariationen konnte kein signifikanter Unterschied im OS und EFS beobachtet werden.

Tab. 15 : Die multivariante Analyse der Genvariation IL-10 -7400 in Abhängigkeit des Gesamtüberlebens nach Anpassung der IPI-Risikofaktoren.

IPI-Faktoren	Relatives Risiko	95% Konfidenzintervall	P-Wert
Erhöhtes LDH	1.7	(1.2; 2.5)	0.005
Alter > 60 Jahre	2.0	(1.3; 3.0)	0.001
ECOG > 1	2.1	(1.4; 3.0)	< 0.001
Stadium III / IV	1.5	(1.0; 2.1)	0.029
Extranodale Beteiligung > 1	1.0	(0.7; 1.4)	0.888
Del/Del	1.9	(1.0; 3.6)	0.037
vs. InsIns; Ins Del			

3.2.4 Der SNP -1087 A/G im IL-10-Gen-Promotor und das klinische Ergebnis beim NHL

Der SNP -1087 A/G ist die am meisten untersuchte Genvariation in der Promotor-Region des IL-10-Gens. Der SNP -1087 A/G wurde daher mit der TaqMan®-PCR in dieser Kohorte gesondert analysiert. Aus den bereits oben genannten Gründen konnten nur eine homogen, gleichmäßig behandelte Kohorte von 425 Patienten von den 500 Patienten der NHL-B1/B2-Studie der DSHNHL und zusätzlich eine ethnisch entsprechend gesunde Kontrollgruppe von 193 Spendern mit der TaqMan®-PCR analysiert werden. Zusätzlich wurden die gewonnenen Daten der Patienten mit Daten über die Gesamtüberlebensrate (OS) und dem ereignisfreien Überleben (EFS) verglichen, die bereits publiziert waren (Pfreundschuh et al. 2004 a, Pfreundschuh et al. 2004 b).

Die Allelfrequenzen und die entsprechenden Genotypen für den SNP -1087 des IL-10-Gens wurden für beide Gruppen ermittelt. Es konnte in der untersuchten Patientengruppe kein erhöhtes Vorkommen des IL-10 -1087 G-Allels beobachtet werden (siehe Tab. 16).

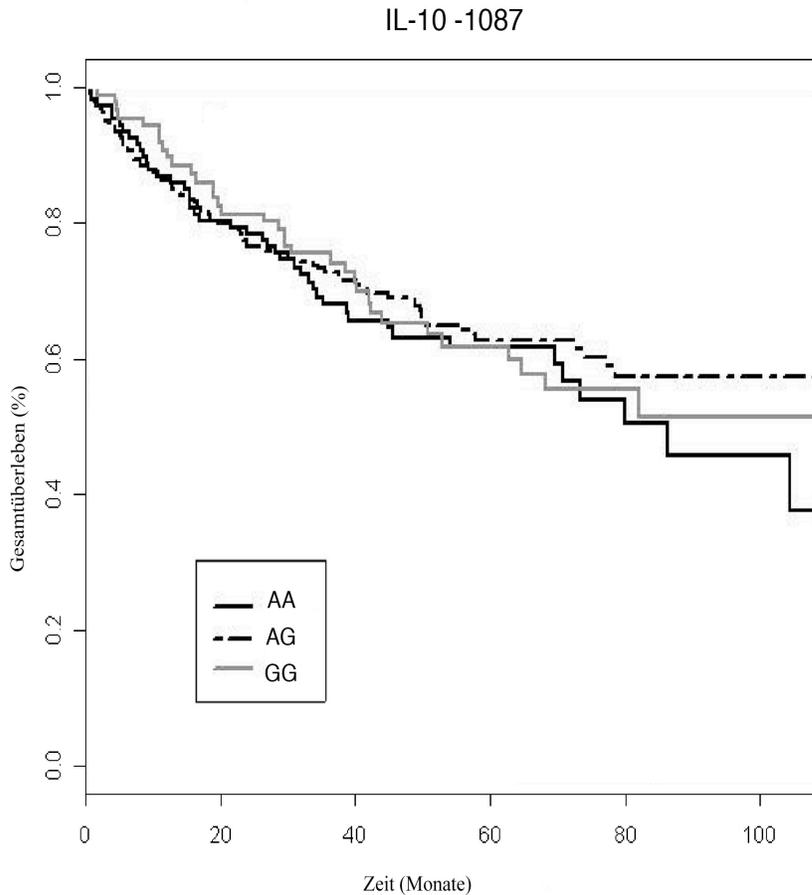
Die Allel- und Genotypfrequenzen der Genvariation IL-10 -1087 unterschieden sich nicht signifikant zwischen der Patientengruppe und der gesunden Kontrollgruppe (P = 0.516) (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Genotypfrequenzen der IL-10-Promotor-Genvariation bei -1087 von 425 NHL Patienten und der gesunden Kontrollgruppe von 193 Spendern.

	Kontrollgruppe	Lymphom-Patienten
Anzahl der Individuen n/ Genotyp-Frequenz (%)	193	425
IL-10 -1087 AA	55 (28.5%)	111 (27.1%)
IL-10 -1087 AG	90 (46.6%)	210 (51.3%)
IL-10 -1087 GG	48 (24.9%)	88 (21.5%)
		P = 0.516

Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied im kumulativen Gesamtüberleben (OS) ($P = 0.704$) und im ereignisfreien Überleben (EFS) ($P = 0.822$) zwischen den Patienten mit dem IL-10 -1087 AA Genotyp und den Genotypen AG bzw. GG (siehe Abb. 9). Die Daten wurden zum Vergleich mit derselben Art und Weise wie in den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Lech-Maranda und von Berglund berechnet (Lech-Maranda et al. 2004, Berglund et al. 2005).

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurven für das kumulative Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit aggressivem NHL im genotypischen Vergleich für den SNP IL-10 -1087.



Im Allgemeinen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen bezüglich der klinischen Darstellung, dem Geschlecht, dem klinischen Stadium, der kompletten Remissionsrate und dem internationalen prognostischen Index (IPI), die in die Betrachtung mit einbezogen wurden. In einem Zeitraum von fünf Jahren waren Gesamtüberlebensrate (OS) und die EFS für die NHL Gruppe ähnlich (OS: 60.2% bzw. 61.8%; PFS: 49.4% bzw. 49.7%). In unserer Studie mit einem Altersbereich zwischen 23 und 75 Jahren waren 67% aller Patienten älter als 60 Jahre.

Die hier analysierte Patientengruppe war bezüglich des IPI, dem Status der Erkrankung, der Anzahl extranodaler Herde und dem Vorhandensein von B-Symptomatik und Bulk Tumor der Patientengruppe der Arbeitsgruppe von Lech-Maranda et al. vergleichbar.

4 Diskussion

Das Non-Hodgkin-Lymphom ist eine Erkrankung des Immunsystems und unterliegt komplexen biologischen Vorgängen, die durch eine Vielzahl von Zytokinen gesteuert werden. Die Expression und Ausschüttung des Zytokins IL-10 ist beim Non-Hodgkin-Lymphom dereguliert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, inwieweit Genvariationen in der 5' flankierenden Region des IL-10 mit der Überlebens- oder der Remissionsrate beim Patienten mit aggressivem NHL assoziiert sind, um prognostische Aussagen über den Verlauf dieser Erkrankung machen zu können.

Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die Methode des Nachweises von Genvariationen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens an drei verschiedenen ethnischen Gruppen evaluiert. Aufbauend auf den Analysen, die im Vorfeld dieser Dissertationsarbeit bereits von M. Mörmann in Tübingen an gesunden Probanden aus Stuttgart (Deutschland) und einem Teilkollektiv aus Lambarene (Gabun, Afrika) durchgeführt worden waren, wurden weitere Polymorphismen untersucht und zusätzlich eine Kohorte aus Vietnam in die Analyse mit eingeschlossen. Dazu wurde der SNP IL-10 -1087 mittels TaqMan®-PCR in allen drei Kohorten analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die angewandte Methode Genvariationen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens an drei geographisch verschiedenen Kohorten nachweisen kann.

Im zweiten Teil wurden Proben einer Gruppe von 500 Patienten aus der NHL-B1/B2-Studie der DSHNHL aufbauend auf den Methoden aus dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit genotypisiert und die Allelfrequenzen der IL-10-Promotor-Region analysiert und mit klinischen Daten verglichen. Im nächsten Schritt wurde die Patientengruppe mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vermutung, dass genetische Polymorphismen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens mit prognostischen Faktoren assoziiert sind sowie auf eine schlechte Prognose des aggressiven NHL hinweisen können. Anhand des großen Patientenkollektivs der NHL-B1/B2-Studie wurde gezeigt, dass die distalen SNP der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens mit dem aggressiven NHL assoziiert sind.

Durch die Multiplex-PCR war es möglich, viele Genvariationen innerhalb eines Locus durch eine einzige in-vitro-Reaktion zeitsparend und mittels geringer Mengen an DNS zu untersuchen. Dabei wurden die Struktur und die Allelfrequenzen der SNP IL-10 -597 A/C, -1087 A/G, -3538 A/T, -6208 C/G, -6754 A/T sowie -7400 in/del an einer asiatischen, europäischen und afrikanischen Kohorte analysiert.

Signifikante Unterschiede in den häufigen Allel- und Genotypfrequenzen in den drei ethnisch unterschiedlichen Kohorten konnten nachgewiesen werden, so dass die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt werden, die auch geographische Polymorphismen zwischen anderen ethnischen Kohorten zeigen (Turner et al. 1997, Perrey et al. 1998, Reynard et al. 2000, Mok et al. 1998, Pravica et al. 1999, Gallagher et al. 1997).

Im genotypischen Vergleich zwischen der europäischen und afrikanischen Kohorte zeigten die Genvariationen -1087 und -6208 ähnliche allelische und genotypische Muster. Der SNP IL-10 -6208 könnte neben dem bereits intensiv untersuchten IL-10 -1087 eine besondere Bedeutung haben, weil die allelischen und genotypischen Muster für beide SNP über die Evolution in beiden Populationen konserviert geblieben sind. Um allerdings ihre Bedeutung für die IL-10-Expression besser verstehen zu können, wäre eine umfangreiche Analyse der Genvariation IL-10 -6208 in zukünftigen Studien hilfreich. Die Vermutung, dass der SNP -6208 einen wichtigen Beitrag zur Regulation von IL-10 leistet, wird durch die Arbeit von M. Mörmann (Mörmann et al. 2004) unterstützt. Darin konnte gezeigt werden, dass der Haployp ACT (SNP -6752/ -6208/ -3538) nach LPS-Stimulation von Zellen mit einer höheren Produktion von IL-10 als bei anderen Haploypen dieser drei SNP assoziiert ist.

Außerdem wurde in den Analysen der distal-medialen Haplotypen der SNP -6752 A/T, -6208 C/G und -3538 A/T festgestellt, dass die asiatische Kohorte über eine geringere Anzahl an vorhandenen Haplotypkombinationen verfügt als die afrikanische oder europäische Kohorte.

Bestimmte Haplotypen kamen vorwiegend in der asiatischen Kohorte vor. Dagegen zeigten die europäische und die afrikanische Kohorte ein variabeleres Muster des erweiterten distalen Haplotyps. Die europäische und afrikanische haplotypische Verteilung des distalen Haplotyps verhielten sich ähnlich zueinander. Die Analyse der Haplotypen der proximalen SNP zusammen mit den medialen und distalen SNP erbrachte in den Versuchen dieser Arbeit ähnliche Ergebnisse. Auch hier gab es in der asiatischen Kohorte eine geringere Variabilität der Haplotypen als bei der afrikanischen oder europäischen Kohorte.

Frühere Arbeiten stellten die Vermutung auf, dass die proximalen SNP und deren Haplotypen mit der Produktion von IL-10 in Zusammenhang stünden (Eskdale et al. 1998, Gibson et al. 2001, Turner et al. 1997, Crawley et al. 1999). Es stellt sich daher die Frage nach der Existenz von erweiterten SNP-Haplotypen, die eine noch stärkere Beziehung zu der Produktion von IL-10 und eine Differenzierung zwischen "low-producer" und "high-producer" erlauben können als die bisherigen einzelnen gefundenen SNP. Der proximale Haplotyp GCC (SNP -1087, -597 und -824) wurde bereits in einer früheren Arbeit als "high-producer" beschrieben, während die proximalen Haplotypen ATA bzw. ACC (SNP -1087, -597 und -824) als "low-producer"-Haplotypen bekannt sind (Crawley et al. 1999).

Da die Qualität des Signals von SNP -824 in der Fragmentanalyse nicht für eine akzeptable Auswertung ausreichte, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, dass der proximale Haplotyp GCC mit verschiedenen distalen Haplotypen verbunden sein könnte.

Der "high-producer"-Haplotyp GCC wäre insbesondere mit dem distalen Haplotyp DTCA vorwiegend in der europäischen und afrikanischen Kohorte vertreten. Dagegen würden die proximalen "low-producer"-Haplotypen ATA bzw. ACC häufig in Kombination mit dem distalen Haplotyp IAGT einhergehen. Der "high-producer"-Haplotyp GCC wäre demnach mit einem variableren Muster mit verschiedenen distalen Haplotypen, insbesondere dem distalen Haplotyp DTCA, verbunden als die "low-producer"-Haplotypen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben dennoch Hinweise für neue erweiterte Haplotypen, die mit "low-producer" bzw. "high-producer" von IL-10 in Verbindung gebracht werden können. Es bedarf einer genaueren Analyse mit einem größeren Kollektiv, um letztendlich diese Vermutung zu bestätigen.

Die vorliegende Arbeit gehört zu einer der ersten, die die Beziehung zwischen den distalen SNP der 5' flankierenden Region und einer der großen Studiengruppe mit aggressivem NHL untersucht. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist durch Evaluation der Multiplex-PCR mit der man verschiedene Genvariation gleichzeitig untersuchen kann und durch die große Anzahl der Patienten mit aggressivem NHL aus der NHL-B1/B2-Studie der DSHNHL-Studiengruppe, die nach einem Studienprotokoll alle nach gleichem Schema therapiert wurden, aussagekräftig und repräsentativ. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vermutung, dass Genvariationen an der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens

wahrscheinlich mit ungünstigen Prognosefaktoren assoziiert sind und einen schlechten Verlauf der aggressiven NHL-Erkrankung voraussagen können.

In der Patientengruppe hatten die Träger des Genotyps IL-10 -7400 Del/Del und die Träger des Genotyps IL-10 -6752 TT ein signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben (OS).

Der spezifische Haplotyp DelTCAGC (IL-10 -7400 Del/Del, -6752 TT, -6208 CC, -3538 AA, -1087 GG, -597 CC) war mit einem schlechten Verlauf des aggressiven NHL assoziiert.

Der hier von allen untersuchten Genvariationen am meisten distal gelegene Bereich SNP IL-10 -7400 zeigte in der multivarianten Analyse für die Träger des Genotyps IL-10 -7400 Del/Del ein ungefähr zweifach höheres Risiko (siehe Tab. 15).

Dieser Genotyp wurde bereits mit einer sehr hohen Expression von IL-10 nach in-vitro-Stimulation mit Lipopolysacchariden beschrieben (Rieth et al. 2004). Er kommt aber sowohl in der europäischen als auch in der afrikanischen und vietnamesischen Kohorte selten vor (siehe Tab. 9) (Mörmann et al. 2004). Dies könnte darauf hindeuten, dass weitere bisher unbekannte Genvariationen im Kopplungsungleichgewicht zum beschriebenen Haplotyp stehen könnten. Daher sind weitere Analysen nach Genvariationen in diesem Bereich des IL-10 Gens und nach anderen immunologisch wichtigen Zytokinen, die mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sind oder die IL-10-Expression beeinflussen, notwendig, um die Rolle von IL-10 in der Genese von Lymphomerkrankungen besser verstehen zu können.

In den meisten Studien wurde der proximale Bereich der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens ausführlich untersucht, wobei die proximalen Haplotypen GCC/ ATA/ ACC (IL-10 -1087, -824 und -597) bereits mit der IL-10-Expressionskapazität in Verbindung gebracht wurden. So konnte z.B. der Haplotyp GCC als IL-10-"high-producer" beschrieben werden (Turner et al. 1997, Gibson et al. 2001, Eskdale et al. 1998, Crawley et al. 1999, Mörmann et al. 2004). Allerdings sind die Vorgänge, welche sich dahinter verbergen, weiterhin unbekannt.

Die Frage nach der genauen Rolle der IL-10-Promotor-Genvariationen, sowohl der proximalen als auch der distalen Haplotypen, die mit der IL-10-Expression assoziieren, bleibt weiterhin offen und muss noch geklärt werden. So wurde bisher der distale Haplotyp TCA (IL-10 -6752, -6208 und -3538) bei Patienten mit NHL nach in-vitro-Stimulation mit Lipopolysacchariden mit einem schlechten ereignisfreien Überleben assoziiert (Mörmann et al. 2004, Rieth et al. 2004).

Es zeigte sich zudem in der Patientengruppe, dass die Träger des Genotyps IL-10 -3538 AA ungefähr doppelt so häufig (>20%) einen IPI > 2 haben im Vergleich zu den Trägern anderer Genotypen ($p = 0,025$). Nach Anpassung nach Bonferroni in der multiplen Testung waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant und können daher nur explorativen Charakter haben.

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass innerhalb der Patientengruppe die Träger des Genotyps IL-10 -3538 AA ein erhöhtes Risiko für einen IPI > 2 haben könnten, sowie dass die Träger der Genotypen IL-10 -7400 Del/Del und IL-10 - 6752 TT ein kürzeres kumulatives Gesamtüberleben haben. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass Genvariationen oder Polymorphismen in den regulatorischen Bereichen der Zytokin-Gene Marker für Tumorprogression sind.

Auf Grund der besonderen Bedeutung von SNP -1087 A/G im IL-10-Gen-Promotor, wie in aktuellen Arbeiten gezeigt (Berglund et al. 2005, Lech-Maranda et al. 2004, Turner et al. 1997, Mörmann et al. 2004, Blay et al. 1993), wurde dieser SNP in der vorliegenden Arbeit mit der TaqMan®-PCR in dieser Kohorte gesondert analysiert und mit den Daten anderer Arbeitsgruppen verglichen (Pfreundschuh et al. 2004 a, Pfreundschuh et al. 2004 b). Die Frequenzen der IL-10 -1087 Allele und die entsprechenden Genotypen unterscheiden sich nicht signifikant, wenn man die Patienten Kohorte mit der gesunden Kontrollgruppe vergleicht. Ein erhöhtes Vorkommen des IL-10 -1087 G-Allels konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich kein Unterschied in OS oder EFS zwischen den Patienten mit dem IL-10 -1087 AA Genotyp und den anderen Genotypen.

Über die Genvariation IL-10 -1087 im Zusammenhang mit malignen Lymphomerkrankungen gibt es verschiedene Meinungen. Die Arbeitsgruppe von Lech-Maranda kam zu dem Ergebnis, dass das IL-10 -1087 G-Allel in einer französischen Patientengruppe mit aggressivem NHL gehäuft auftrat, und dass, im Vergleich zum Genotypen IL-10 -1087 AA, die Genotypen mit dem G-Allel (IL-10 -1087 GG und AG) mit einer längeren EFS und mit einer besseren OS einhergehen (Lech-Maranda et al. 2004).

Dagegen wurde in einer australischen Studie der Arbeitsgruppe von Cunningham das Gegenteil festgestellt. Die Frequenz des IL-10 -1087 A Allels, welches als "low-producer"-Allel bekannt ist, war bei Patienten mit aggressivem NHL signifikant höher im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Cunningham et al. 2003). Ebenso waren die Frequenzen der proximalen Haplotypen ATA und ACC (SNP -1087, -824 und 597), welche als "low-

producer"-Haplotypen bekannt sind, in der Patientengruppe signifikant höher im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Cunningham et al. 2003).

In einer schwedischen Studie der Arbeitsgruppe von Berglund konnte keiner dieser beiden Ergebnisse bestätigt werden. Die Frequenz des IL-10 -1087 G-Allels unterschied sich nicht signifikant von der schwedischen Patientengruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Eine erhöhte Allelfrequenz vom IL-10 -1087 G-Allel fand sich auch nicht in der schwedischen Patientengruppe. Auch gab es keinen genotypischen Unterschied innerhalb der Patientengruppe in Bezug auf Gesamtüberleben und den klinischen Parametern. Allerdings waren die Patienten der schwedischen Kohorte im Vergleich zu den anderen ethnischen Kohorten älter und hatten ein kürzeres mittleres Überleben ("medium survival") (Berglund et al. 2005).

Die analysierte Patientengruppe in der vorliegenden Arbeit ist dagegen nach den ECOG-Kriterien mit der Kohorte von Lech-Maranda vergleichbar. Dennoch konnte die vorliegende Arbeit die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Lech-Maranda nicht bestätigen. Die Arbeitsgruppe von Lech-Maranda hat zudem nach Anpassung des IL-10 -1087 G-Allels an die prognostischen Variablen des IPI die Vermutung gestellt, dass das IL-10 -1087 G-Allel eine unabhängige Variable ist, die die EFS voraussagen könnte. Die Patientengruppe der vorliegenden Arbeit zeigte dagegen keine erkennbare Abhängigkeit zwischen den IL-10-Genvariationen und den prognostischen Variablen, EFS oder OS. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen am ehesten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Berglund. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Lech-Maranda zeigen in gewisser Weise eine Diskrepanz, denn es ist bekannt, dass ein erhöhter Anteil von IL-10 im Serum mit ungünstigen prognostischen Faktoren und für einen schlechten Verlauf des malignen Lymphoms assoziiert ist. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Lech-Maranda zeigen aber, dass deren untersuchte Kohorte mit dem IL-10 -1087 G-Allel, auch als "high-producer"-Allel bekannt, mit einer besseren OS und längeren EFS einhergeht.

Ursächlich für die Diskrepanz der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen könnten die unterschiedlichen ethnischen Kohorten sein, welche analysiert wurden. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits auf die geographischen Polymorphismen hingewiesen, in denen sich die Verteilung der Allele und Genotypen der einzelnen Genvariationen zwischen den ethnischen Gruppen unterscheiden, was auch in anderen Arbeiten bestätigt wird (Turner et al. 1997, Perrey et al. 1998, Reynard et al. 2000, Mok et al. 1998). Andere Gründe für die

Diskrepanz der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen können auch unterschiedliche Patientencharakteristiken, diverse Behandlungsoptionen und die mittlere OS sein.

Diese Diskrepanz deutet wieder darauf hin, dass weitere bisher unbekannte Genvariationen im Bereich des IL-10-Gens oder auch andere Zytokine mit dem Krankheitsverlauf assoziiert sein könnten. Mörmann konnte in seiner Dissertationsarbeit zeigen, dass die IL-10-Sekretion nicht nur allein von dessen Gen-Promotor-Polymorphismus abhängt, sondern auch von der Art der Substanz, mit der die Zellen stimuliert werden und somit auch den Verlauf der Erkrankung beeinflussen (Mörmann et al. 2004). Es ist bereits bekannt, dass eine erhöhte oder erniedrigte IL-10-Sekretion den Verlauf maligner Lymphomerkrankungen beeinflusst (Benjamin et al. 1992, Emilie et al. 1992). Es wurde ebenfalls schon in anderen Arbeiten gezeigt, dass ein einzelnes Allel nicht verantwortlich für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf sein kann (Warzocha et al. 1998, Juszczynski et al. 2002).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass noch weitere Genvariationen den Verlauf und die Neigung zu malignen Lymphomerkrankungen beeinflussen.

Es ist unwahrscheinlich, dass die IL-10 –1087-Genvariation allein die inter-individuell unterschiedliche IL-10-Expression beeinflusst. Eine Arbeit stellt die Vermutung auf, dass die Genvariation IL-10 –3575 mit einem erhöhten Risiko für NHL assoziiert sei (Rothman et al. 2006). Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Trotzdem wird die Hypothese über weitere Genvariationen innerhalb des Gens für IL-10 unterstützt, die mit dem Risiko und dem klinischen Bild maligner Lymphomerkrankungen einhergehen.

Um letztendlich die regulatorische Rolle der vererbten IL-10-Expression in der Pathogenese der Lymphom-Erkrankungen verstehen zu können, müssen zum einen die Daten der molekularen Klassifikationen und der Epidemiologie und zum anderen die Ergebnisse gut strukturierter größerer klinischer Studien sowie die entsprechenden in-vitro-Analysen gemeinsam in Betracht gezogen werden.

Die genauen Vorgänge der IL-10-Expression und die Frage, wie genau der erhöhte Serumwert von IL-10 den Fortschritt des malignen Lymphoms beeinflusst, bleibt weiterhin unbeantwortet. Einzelne SNP wie z.B. IL-10 –1087 oder IL-10 –7400 könnten eventuell als Marker für die Voraussage des klinischen Bildes maligner Lymphome nützlich sein. Zur Zeit reichen sie allerdings noch nicht als prognostischer Faktor für den routinemäßigen Gebrauch aus. Ob IL-

10 -7400DelDel ein Risikofaktor für das Gesamtüberleben für Patienten mit aggressivem NHL ist, wird deswegen als Arbeitshypothese in weiteren Studien zu verifizieren sein.

Bessere prognostische Informationen könnten aus zukünftigen Studien mit Kombinationen von Polymorphismen mehrerer Gene gewonnen werden, um letztlich entscheiden zu können, welcher Patient von welcher Therapie profitieren würde.

Die Fortführung der Identifikation von weiteren Genvariationen von Zytokinen, die maligne Lymphomerkrankungen beeinflussen, kann dabei helfen, die immunologischen Pathomechanismen dieser Erkrankungen besser zu verstehen, später einmal selbst diese Vorgänge zu steuern oder auch um die Neigung und den Verlauf solcher Erkrankungen besser zu prognostizieren. Die vorliegende Arbeit stellt hierzu eine Basis für weitere Analyse der malignen Lymphomerkrankung und darüber hinaus vieler weiterer Erkrankungen dar, in denen die Produktion von IL-10 dereguliert ist.

5 Zusammenfassung

Das Non-Hodgkin-Lymphom ist eine Erkrankung des Immunsystems und unterliegt komplexen biologischen Vorgängen, die durch eine Vielzahl von Zytokinen gesteuert werden. Die Expression und Ausschüttung des Zytokins IL-10 ist beim Non-Hodgkin-Lymphom dereguliert. Die Vorgänge der Deregulierung des Immunsystems bei Lymphomerkrankungen und deren Auswirkung auf den klinischen Verlauf sind noch ungenügend verstanden. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Genvariationen im IL-10-Genlokus mit dem klinischen Verlauf des aggressiven NHL assoziiert sind.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mittels Multiplex-PCR und der sich anschließenden Fragmentlängenanalyse Genvariationen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens an drei geographisch verschiedenen Kohorten nachgewiesen werden können.

Im zweiten Teil wurden Proben einer Gruppe von 500 Patienten aus der NHL-B1/B2-Studie der DSHNHL aufbauend auf den Methoden aus dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit genotypisiert und die Allelfrequenzen der IL-10-Promotor-Region analysiert und mit klinischen Daten verglichen. Die Patientengruppe wurde anschließend einer gesunden Kontrollgruppe gegenübergestellt. In der Patientengruppe hatten die Träger des Genotyps IL-10 -7400 Del/Del und die Träger des Genotyps IL-10 -6752 TT ein signifikant kürzeres kumulatives Gesamtüberleben (OS). Es zeigte sich zudem in der Patientengruppe, dass die Träger des Genotyps IL-10 -3538 AA fast doppelt so häufig einen IPI > 2 haben als Träger anderer Genotypen. Die Analysen des SNP -1087 A/G im IL-10-Gen-Promotor mittels der TaqMan®-PCR haben gezeigt, dass die Frequenzen der IL-10 -1087 Allele und die entsprechenden Genotypen sich nicht signifikant unterscheiden, wenn man die Patientenkohorte mit der gesunden Kontrollgruppe vergleicht. Ein erhöhtes Vorkommen des IL-10 -1087 G-Allels konnte nicht beobachtet werden. Es zeigte sich kein Unterschied in OS oder EFS zwischen den Patienten mit dem IL-10 -1087 AA Genotyp und den anderen Genotypen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass genetische Polymorphismen innerhalb der 5' flankierenden Region des IL-10-Gens mit prognostischen Faktoren assoziiert sind sowie auf eine schlechte Prognose des aggressiven NHL hinweisen können.

6 Literaturverzeichnis

1. Aman MJ, Tretter T, Eisenbeis I, Bug G, Decker T, Aulitzky WE, Tilg H, Huber C, Peschel C (1996): Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood* 87, 4731-6
2. Armitage JO (1993). Treatment of non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 328, 1023-1030
3. Armitage JO, Fyfe MA, Lewis J (1984). Long-term remission durability and functional status of patients treated for diffuse histiocytic lymphoma with the CHOP regimen. *J Clin Oncol* 2, 898-902
4. Barsig J, Kusters S, Vogt K, Volk HD, Tiegs G, Wendel A (1995): Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 25, 2888-93
5. Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA (1992): Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood* 80, 1289-98
6. Benjamin D, Park CD, Sharma V (1994). Human B cell interleukin 10. *Leuk Lymphoma* 12, 205-10
7. Berglund M, Thunberg U, Roos G, Rosenquist R, Enblad G (2005): The interleukin-10 gene promoter polymorphism (-1082) does not correlate with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 105, 4894-5
8. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C (2001) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2, 61-70
9. Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot MC (1993): Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 82, 2169-74
10. Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, Jacobson LP, Smith MW, O'Brien SJ, Chmiel JS, Rinaldo CR, Lai S and Martinez-Maza O (2003): Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL10, or the IL10 promoter -592 C/C genotype. *Clin Immunol* 109, 119-29
11. Burdin N, Rousset F, Banchereau J (1997): B-cell-derived IL-10: production and function. *Methods* 11, 98-111
12. Caligaris-Cappio F (2001): How immunology is reshaping clinical disciplines: the example of haematology. *Lancet* 358, 49-55

13. Cervenak L, Morbidelli L, Donati D, Donnini S, Kambayashi T, Wilson JL, Axelson H, Castanos-Velez E, Ljunggren HG, De Waal Malefyt R (2000): Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. *Blood* 96, 2568-73
14. Chatterjee N, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, Davis S, Ishibe N, Colt J, Goldin L and Severson RK (2004): Risk of non-Hodgkin's lymphoma and family history of lymphatic, hematologic, and other cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1415-21
15. Choi SJ, Szoka FC (2000): Fluorometric determination of deoxyribonuclease I activity with PicoGreen. *Anal Biochem.* 281(1):95-7
16. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P (1993): Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 177, 523-7
17. Cohen SB, Parry SL, Feldmann and Foxwell (1997): Autocrine and paracrine regulation of human T-cell IL-10 production: *J Immunol* 158, 5596-5602
18. Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK (1988): Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988.1, 969-71
19. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P (1999): Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42, 1101-8
20. Cunningham LM, Chapman C, Dunstan R, Bell MC, Joske DJ (2003): Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non- Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44, 251-5
21. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-20
22. De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE (1992): Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 4, 314-20
23. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE (1993): Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150, 4754-65
24. Emilie D, Touitou R, Raphael M, Peuchmaur M, Devergne O, Rea D, Coumbraras J, Crevon MC, Edelman L, Joab I and Galanaud P (1992): In vivo production of interleukin-10 by malignant cells in AIDS lymphomas. *Eur J Immunol* 22, 2937-42

25. Eskdale J, Gallagher G (1995): A polymorphic dinucleotide repeat in the human IL-10 promoter. *Immunogenetics* 42, 444-5
26. Eskdale J, Kube D, Gallagher G (1996): A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL10 gene. *Immunogenetics* 45, 82-3
27. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G (1997): Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 49(6):635-9
28. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW (1998): Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9465-70
29. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G (1999): Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun* 1, 151-5
30. Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM (1998): Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF-alpha: role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 160, 920-8
31. Gallagher G, Eskdale J, Oh HH, Richards SD, Campbell DA, Field M (1997): Polymorphisms in the TNF gene cluster and MHC serotypes in the West of Scotland. *Immunogenetics* 45, 188-94
32. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP (2001): Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166, 3915-22
33. Greten H: *Innere Medizin*. 11. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2002
34. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392
35. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J (1999): World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17, 3835-3849.
36. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJP, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermot MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S (2002): Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, Supplement 2. *Genes Immun* 3, 313-30

37. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO (1996): Lymphoma classification - the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 88, 4085-9
38. Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Lahdenpohja N, Pasternack A, Hurme M (2001): Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 44, 176-9
39. Ibelgaufs H: *Gentechnologie von A bis Z. Korrigierter Nachdruck* 1993. Wiley-VCH. Weinheim 1990
40. Juszczynski P, Kalinka E, Bienvenu J, Woszczek G, Borowiec M, Robak T, Kowalski M, Lech-Maranda E, Baseggio L, Coiffier B (2002): Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood* 100, 3037-40
41. Kaiser U, Uebelacker I, Abel U, Birkmann J, Trümper L, Schmalenberg H, Karakas T, Metzner B, Havemann K, Bischoff HG (2002): Randomized study to evaluate the use of high-dose therapy as part of primary treatment for "aggressive" lymphoma. *J Clin Oncol* 20, 4413-9
42. Korsmeyer SJ (1992): Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80, 879-886
43. Korsmeyer SJ (1999): BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59, 1693-1700
44. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP (2000): Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 1, 185-90.
45. Kube D, Laser H, von Knethen A, Straub H, Bohlen H, Hafner M, Tesch H. (1995): Isolation of the human Interleukin-10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 7, 1-7
46. Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremsner P, Gallagher G (2001 a): Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes Immun* 2, 181-90
47. Kube D, Schmidt D, Mormann M, Uhlemann AC, Tomiuk J, Tesch H, Kremsner PG (2001 b): Semiautomated and simultaneous analysis of the interleukin-10 gene microsatellites IL-10G and IL-10R by fluorescence-based polymerase chain reaction reveals significant differences in allele distributions between Caucasians (Germany) and Africans (Gabon). *Eur Cytokine Netw* 12, 537-44
48. Kube D, Mormann M, Tomiuk J, Rieth H, Hua TD, Kremsner PG, Vockerodt M

- (2003): Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction. *Genes Immun* 4, 459-68
49. Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, Warzocha K, Coiffier B, Salles G (2004): Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 103, 3529-34
50. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ (1998): Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet* 352, 113
51. Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau CS (1998): Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 1090-5
52. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993): Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-90
53. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765
54. Mörmann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL, Kremsner PG, Luty AJ, Kube D (2004): Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun* 5, 246-55
55. Neri A, Knowles DM, Greco A, McCormick F, Dalla-Favera R (1988): Analysis of RAS oncogenes in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9268-9272
56. Packer BR, Yeager M, Burdett L, Welch R, Beerman M, Qi L, Sicotte H, Staats B, Acharya M, Crenshaw A, Eckert A, Puri V, Gerhard DS, Chanock SJ (2006). SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res* 34, D617-21
57. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1998): Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 6, 193-7
58. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rube C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Eimermacher H (2004 a): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 634-41

59. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D (2004 b): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104, 626-33
60. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1999): In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26, 1-3
61. Raymond M, Rousset F (1995): A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86, 248-249
62. Rep MH, Hintzen RQ, Polman CH, van Lier RA (1996): Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol* 67, 111-8
63. Reynard MP, Turner D, Navarrete CV (2000): Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. *Eur J Immunogenet* 27, 241-9
64. Rieth H, Mormann M, Luty AJ, Assouhou-Luty CA, Roupelieva M, Kremsner PG, Kube D (2004): A three base pair gene variation within the distal 5'-flanking region of the interleukin-10 (IL-10) gene is related to the in vitro IL-10 production capacity of lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw* 15, 153-8
65. Ross ME, Caligiuri MA (1997): Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 89, 910-8
66. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, Spinelli JJ, Willett E, De Sanjose S, Cocco P (2006): Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 7, 27-38
67. Rousset F, Garcia E, Banchereau J (1991): Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med* 173, 705-10
68. Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Barbier Y, Doche C, Warzocha K, Gutowski MC, Rieux C, Coiffier B (1996): Elevated circulating levels of TNFalpha and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients. *Br J Haematol* 93, 352-9
69. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York 1989

70. Seyffert W: Lehrbuch der Genetik. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2003
71. Shipp MA (1997): Can we improve upon the International Index? *Ann Oncol* 8, 43-7
72. Song le H, Binh VQ, Duy DN, Kun JF, Bock TC, Kremsner PG, Luty AJ (2003): Serum cytokine profiles associated with clinical presentation in Vietnamese infected with hepatitis B virus. *J Clin Virol* 28, 93-103
73. Tilg H, Peschel C (1996): Interferon-alpha and its effects on the cytokine cascade: a pro- and anti-inflammatory cytokine. *Leuk Lymphoma* 23, 55-60
74. Tracey KJ (1995): TNF and Mae West or: death from too much of a good thing. *Lancet* 345, 75-6
75. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A (1988): Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 167, 1211-27
76. Trümper L, Möller P, Neubauer A: Non Hodgkin Lymphome; in: Lehrbuch der Klinischen Onkologie, hrsg. v. Hiddemann W, Huber H, Bertram CR; Springer Verlag, Heidelberg 2004, 535-556
77. Turner D, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1997): An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24, 1-8
78. Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Dumontet C, Renard N, Neidhardt-Berard EM, Coiffier B (1997): Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol* 15, 499-508
79. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G (1998): Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 91, 3574-81
80. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A (1997): Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 349, 1912-3
81. Wunderlich A, Kloess M, Reiser M, Rudolph C, Trümper L, Bittner S, Schmalenberg H, Schmits R, Pfreundschuh M and Loeffler M (2003): Practicability and acute haematological toxicity of 2- and 3-weekly CHOP and CHOEP chemotherapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results from the NHL-B trial of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Ann Oncol* 14, 881-93

7 Publikationen in Zusammenhang mit dieser Dissertation

1. Kube D, Mormann M, Tomiuk J, Rieth H, Hua TD, Kremsner PG, Vockerodt M (2003): Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction. *Genes Immun* 4(7): 459-68.
2. Kube D, Hua TD, Klöss M, Kulle B, Brockmöller J, Wojnowski L, Löffler M, Pfreundschuh M, and Trümper L (2007): The interleukin-10 gene promoter polymorphism -1087AG does not correlate with clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Immun* 8: 164-167.
3. Kube D, Hua TD, von Bonin F, Schoof N, Zeynalova S, Klöss M, Gocht D, Potthoff B, Tzvetkov M, Brockmöller J, Löffler M, Pfreundschuh M, Trümper L (2008): Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin Cancer* 14(12):3777-84.
4. Mörmann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL, Kremsner PG, Luty AJ, Kube D (2004): Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun* 5(4): 246-55.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei folgenden Personen für ihre Unterstützung und Hilfe herzlich bedanken:

Herrn PD. Dr. rer. nat. Kube, D.
Frau Dr. Kulle, B.
Frau von Bonin, F.
Herrn Dr. Song, L.
Frau Zeynalova, S.
Frau Klöss, M.;

dem Laborteam der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universität Göttingen von Prof. Dr. Trümper, L. für die Bereitstellung der Geräte und Materialien;

der Abteilung der Molekularen Pharmakologie der Universität Göttingen von Prof. Dr. Brockmüller für die Möglichkeit der Durchführung der TaqMan®-PCR;

Frau Künzel, F. und Herrn Birkholz, S. für die hilfreichen Bemerkungen und Ratschläge.

Lebenslauf

Ich, Thanh Duc Hua, wurde am 18.03.1980 als einziges Kind des Lichtbogenschweißers Thanh Ty Hua und der Krankenschwester My Dung Dao in Hanau (Deutschland) geboren.

Von 1990 bis 1997 besuchte ich die katholische Privatschule Engelsburg in Kassel und von 1997 bis 1999 das Oberstufen-Gymnasium Jakob-Grimm-Schule in Kassel, an dem ich im Mai 1999 die allgemeine Hochschulreife erlangte.

Im Wintersemester 1999/2000 immatrikulierte ich mich zum Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, an der ich im August 2002 und im Februar 2005 die ärztlichen Vorprüfungen (1. und 2. Staatsexamen) bestand. Zum Sommersemester 04/05 absolvierte ich das praktische Jahr in den Abteilungen Dermatologie, Chirurgie und Innere Medizin an der Uni-Klinik Göttingen. Im Mai 2006 bestand ich die mündliche Prüfung zum 3. Staatsexamen und erlangte meine Approbation.

Meine Facharztausbildung zum Allgemeinarzt begann ich im Dezember 2006 zunächst in der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie der Uni-Klinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Becker und setzte sie in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie unter der Leitung von Prof. Hasenfuß an der Uni-Klinik Göttingen fort.

Seit Mai 2008 arbeite ich in der Abteilung Innere Medizin unter der Leitung von Prof. Schifferdecker im Elisabeth-Krankenhaus in Kassel.