

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Kneba)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Klonspezifische IGH-Plasmide als alternativer Standard zur Quantifizierung
minimaler Resterkrankung mittels Real-Time PCR beim folliculären
Non-Hodgkin Lymphom**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
TOBIAS LAUBENSTEIN
aus Heide (Schleswig-Holstein)

Kiel 2017

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Christiane Pott

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Ilske Oschlies

Tag der mündlichen Prüfung:

21.06.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

31.03.2018

gez.: Prof. Dr. med. Heinz-August Horst

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	5
2 Material und Methoden	9
2.1 Arbeitsmaterialien.....	9
2.1.1 Material und Geräte.....	9
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien, Bakterienzellen.....	10
2.1.3 Software	12
2.2 Probenmaterialien.....	12
2.2.1 Patientenproben und Zelllinie.....	12
2.2.2 DNA-Extraktion	13
2.3 IGH-PCR, Klonalitätsanalyse und Sequenzierung.....	13
2.3.1 FR1-IGH-PCR.....	13
2.3.2 Klonalitätsanalyse der FR1-IGH-PCR-Produkte.....	16
2.3.3 Sequenzierung der FR1-IGH-PCR-Produkte	17
2.4 Erstellung von Plasmid-Standards für die RQ-PCR.....	19
2.4.1 Klonierung der IGH-PCR-Produkte	19
2.4.2 M13-Sequenzierung der IGH-Plasmide	20
2.4.3 Restriktionsverdau und Aufreinigung der IGH-Plasmide	21
2.4.4 Standardkurven aus IGH-Plasmiden.....	21
2.5 Quantitative Real-Time IGH-PCR (IGH-RQ-PCR).....	24
2.5.1 Primer und Sonden für die IGH-RQ-PCR.....	26
2.5.2 Reaktionsbedingungen der IGH-RQ-PCR	27
2.5.3 Standardkurven aus genomischer DNA	29
2.5.4 RQ-PCR von Patientenproben im Krankheitsverlauf.....	29
2.5.5 Albumin-RQ-PCR als interner Standard.....	30
2.5.6 IGH-RQ-PCR anhand klonspezifischer Plasmid-Standards..	31
2.6 Statistische Auswertung	32

3	Ergebnisse	33
3.1	Klonalitätsanalyse der IGH-PCR-Produkte	33
3.2	Etablierung und Validierung der Plasmid-Standards.....	37
3.3	MRD-Verlaufsanalysen anhand der Plasmid-Standards .	46
4	Diskussion	51
5	Zusammenfassung	57
	Literaturverzeichnis	59
	Abbildungsverzeichnis	64
	Tabellenverzeichnis.....	66
	Danksagung	68
	Lebenslauf.....	69
	Publikationen	70

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ASO	Allelspezifisches Oligonukleotid; in dieser Arbeit RQ-PCR-Primer oder -Sonde mit Komplementarität zu einer patientenspezifischen Sequenz
Auto SZT	Autologe Stammzelltransplantation
BC	Buffy Coat (gepoolte DNA aus lymphozytären Zellen mehrerer gesunder Spender)
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin Lymphom
BSA	Bovines Serumalbumin
ccdB-Gen	Gen, welches bei Bakterien den Zelltod induziert durch Expression eines Gyrase-Hemmstoffes (engl. control of cell death-Gen B)
CDR3-Region	Hypervariable Region der Immunglobuline (engl. complementarity determining region)
CHOP	Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
C4D1	1. Tag des 4. Chemotherapiezyklus der GADOLIN-Studie (engl., cycle 4 day 1)
CR	komplette klinische Remission (engl. complete clinical remission)
CT	Cycle Threshold, Fluoreszenz-Schwellenwert in der RQ-PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
dNTP's	Desoxynukleotidtriphosphate
EFS	Ereignisfreies Überleben (engl. event free survival)
EOI	Zeitpunkt nach Abschluss der Induktionschemotherapie der GADOLIN-Studie (engl. end of induction)
EuroMRD-Guidelines	Leitlinien des Europäische Konsortiums zur MRD-Diagnostik, Division der ESLHO (früher European Study Group on MRD-Detection in ALL, ESG-MRD-ALL-Guidelines)

FACS	Fluoreszenzgestützte Immunphänotypisierung (engl. fluorescence-activated cell sorting)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Folikuläres Lymphom
FR1/ -2/ -3-Region	Konservierte Gerüstregionen der Immunglobulingene (engl. framework region)
gDNA	genomische DNA
GLSG	Deutsche Studiengruppe für niedrigmaligne Lymphome (engl. German Low-Grade Lymphoma Study Group)
IGH	Immunglobulin-Schwerkette (engl. immunoglobulin heavy chain) oder Immunglobulin-Schwerkettengen-Locus
MCL	Mantelzelllymphom
MRD	Minimale Resterkrankung (engl. minimal residual disease)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OS	Gesamtüberleben (engl. Overall survival)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl. progression free survival)
QR	Quantitativer Messbereich eines RQ-PCR-Assay, entspricht der Spezifität (engl. quantitative range)
R-CHOP	Rituximab + Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Prednisolon
RQ-PCR	quantitative Real-Time PCR (engl. real-time quantitative PCR)
SCR	Zeitpunkt des Screenings (engl.) der GADOLIN-Studie
t(14;18)-Translokation	Balancierte t(14;18)(q32;q21)-Translokation mit Bildung eines BCL2/IGH-Fusionsgen
UPN	Willkürlich vergebene Patientenummer; Pseudonymisierung im Rahmen dieser Arbeit (engl. unique patient number)
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

Das folliculäre Non-Hodgkin Lymphom (FL) ist eine maligne klonale Erkrankung der lymphatischen B-Zelle und wird nach der WHO-Klassifikation von 2008 den reifzelligen B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen (B-NHL) zugeordnet (Jaffe 2009; Swerdlow et al. 2008). FL sind insgesamt für etwa 20 - 25 % aller Non-Hodgkin Lymphome (NHL) verantwortlich und stellen somit die häufigste Entität innerhalb der klinischen Subgruppe der indolenten NHL dar (Hitz et al. 2011; Salles 2007). Trotz enormer Fortschritte in der Behandlung, vor allem durch die Implementierung der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern und daraus resultierender Verlängerung des Gesamtüberlebens, erleiden die Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung regelhaft Rezidive (Salles 2007; Dreyling 2010). Ursprung dieser Rezidive können geringe Mengen residualer Lymphomzellen sein, welche trotz gutem klinischen Ansprechen auf eine Therapie im Organismus verbleiben. Man bezeichnet dies als minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD). Die MRD entzieht sich konventionellen diagnostischen Methoden, wie Zytomorphologie und Histopathologie, und ist nur bei entsprechender methodischer Sensitivität detektierbar (Szczepanski et al. 2001). Neben der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) mit einer Sensitivität bis 10^{-4} , was dem Nachweis von einer Lymphomzelle auf 10.000 normalen Zellen entspricht, stellt die quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) mit einer Sensitivität bis 10^{-5} , entsprechend einer Lymphomzelle in 100.000 normalen Zellen, derzeit die am breitesten angewandte und standardisierte Methode der MRD-Diagnostik bei folliculären Lymphomen dar.

Die klinische Signifikanz und prognostische Relevanz der MRD wurde in den vergangenen Jahren für zahlreiche Krankheitsentitäten, beispielsweise die akuten Leukämien (Campana 2010; Brüggemann et al. 2006; Miyazaki et al. 2012) und hier insbesondere für die akute lymphatische Leukämie (ALL) sowie für die chronische myeloische Leukämie (CML) (Hochhaus et al. 2000; Szczepanski et al. 2001), die chronische lymphatische Leukämie (CLL) als indolentes Non-Hodgkin Lymphom (Böttcher et al. 2012) und ebenso für das Mantelzelllymphom (MCL) gezeigt (Pott 2011; Pott et al. 2010; Metzner et al. 2014).

Auch für das folliculäre Lymphom ist die Bedeutung der MRD mehrfach belegt worden. So konnte der positive prognostische Einfluss der Retransfusion MRD-negativer Stammzellpräparate hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens (PFS) nach autologer Stammzelltransplantation (auto SZT) gezeigt werden (Gribben et al. 1991; Freedman et al. 1999). Sowohl in der Ära vor Einführung des monoklonalen Anti-CD-20-Antikörpers Rituximab (Lopez-Guillermo et al. 1998), als auch danach (Czuczman et al. 2001) konnte eine Korrelation von molekularer und klinischer Remission gezeigt werden, was sich für MRD-negative Patienten in klinischer Remission in einem verlängerten progressionsfreien Überleben ausdrückte (Rambaldi et al. 2002). Ebenso konnte der prädiktive Nutzen des MRD-Monitoring bezüglich der Früherkennung von Patienten mit erhöhtem Risiko für ein Rezidiv der Erkrankung belegt werden (Rambaldi et al. 2005; Hirt et al. 2008). Auch im Rahmen einer intensiven Chemotherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation konnte gezeigt werden, dass das Erreichen einer molekularen Remission vor und nach der Transplantation ein signifikanter prognostischer Parameter für das rezidivfreie oder progressionsfreie Überleben darstellt (Moos et al. 1998; Gribben et al. 1993). Sowohl nach Behandlung mit einer Hochdosis-Chemotherapie, als auch nach konventioneller Chemotherapie, stellt die molekulare Remission einen unabhängigen prognostischen Faktor in der multivariaten Analyse dar (Galimberti et al. 2014; Ladetto et al. 2013; Ladetto et al. 2008; Ladetto et al. 2006).

Die charakteristische molekulargenetische Alteration des FL, die balancierte t(14;18)(q32;q21)-Translokation, hat aufgrund der Juxtaposition des antiapoptotischen BCL2-Gens in die Nähe einer Promotorregion des Immunglobulin-Schwerkettengens (IGH), eine Apoptosehemmung und Kumulation klonaler B-Zellen zur Folge, was letztlich in einer malignen Transformation resultieren kann (Yang und Korsmeyer 1996; Viardot et al. 2002; Lo Coco et al. 1993; Hummel et al. 2006). Obwohl die Translokation t(14;18) auch in geringem Maße im peripheren Blut gesunder Probanden gefunden werden kann, stellt das BCL2/ IGH-Fusionsgen eine spezifische Veränderung und somit einen für die RQ-PCR geeigneten Marker beim FL dar (Lefranc 2003a; Mullis et al. 1986). Die Translokation

t(14;18) ist insgesamt bei etwa 90 % der Patienten mit FL mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachweisbar (Leich et al. 2011; Aster und Longtine 2002), jedoch nur in etwa 50 - 60 % dieser Fälle mittels Multiplex-PCR amplifizierbar (Evans et al. 2007; van Dongen et al. 2003; Ott et al. 2002; Katzenberger et al. 2004).

Klonale Immungen-/ T-Zell-Rezeptorgen-Umlagerungen der B- und T-Lymphozyten können ebenfalls als Zielstrukturen für die MRD-Erfassung lymphatischer Neoplasien verwendet werden (van Dongen et al. 2003; Szczepanski et al. 2001; Brüggemann et al. 2000; Ciudad et al. 1998). Den geeignetsten Genabschnitt zum Nachweis der Klonalität von B-Lymphozyten stellt dabei der Immunglobulin-Schwerkettengen (IGH)-Lokus dar. Dieser besteht aus drei hypervariablen Regionen (complementarity determining region, CDR1-3) und vier konservierten „framework“-Regionen (FR1-4). Die CDR sind für die Bildung der Antikörperbindungsstelle verantwortlich, wohingegen die „framework“-Regionen zur Konformationserhaltung dienen. Für die Produktion funktioneller Antikörper durch die B-Zelle ist eine Umlagerung der in Keimbahnkonfiguration vorliegenden Genabschnitte des IGH-Gens auf Chromosom 14 erforderlich. Dabei werden Sequenzabschnitte, die für die hypervariable Region des Antikörpers kodieren unter Einfügung sogenannter N-Nukleotide neu mit einander kombiniert (rearrangiert). Jede B-Zelle weist somit ein individuelles IGH-Rearrangement auf (Lefranc 2003b; Lefranc 2003a; Tonegawa 1983; Burrows und Cooper 1997). Im Falle eines B-Zell-Lymphoms weisen die klonalen Lymphomzellen ein identisches IGH-Rearrangement auf, das mittels Konsensus-PCR detektiert werden kann. Die Detektionsfrequenz für das FL liegt mit einer standardisierten Multiplex-PCR (FR1-, FR2- und FR3-PCR) bei 86 % (Evans et al. 2007; van Dongen et al. 2003). Die derzeit sensitivste und am besten standardisierte Methode zur MRD-Quantifizierung ist die allelspezifische RQ-PCR (ASO-RQ-PCR), die auf der Verwendung allelspezifischer Primer für die klonalen Immungen-Umlagerungen des jeweiligen Lymphomzell-Klon beruht. Im Regelfall erreicht die Sensitivität der ASO-RQ-PCR 10^{-5} .

Für die quantitative Erfassung der t(14;18)-Translokation werden keine klonspezifischen Primer benötigt, hier kann ein bruchpunktspezifischer Vorwärtsprimer im Chromosom 18 platziert und mit einer Konsensus-Sonde und einem reversen Primer in der joining-Region

verwendet werden (Ladetto et al. 2008). Diese Methode ist daher wesentlich einfacher durchführbar und wurde in den meisten publizierten Studien zur MRD-Erfassung von FL eingesetzt. Allerdings können auf diese Weise, wie zuvor beschrieben, nur 50-60 % aller Patienten mit FL erfasst werden (Evans et al. 2007).

Die Quantifizierung von Verlaufsproben mittels RQ-PCR erfolgt im Allgemeinen über die Erstellung einer seriellen Standardverdünnungsreihe aus diagnostischem Primärmaterial mit bekannter Kopienzahl. Dies stellt für nodale Lymphome eine besondere Herausforderung dar. Zum einen ist aufgrund des nodalen Charakters dieser Lymphome häufig keine ausreichend hohe Infiltration von peripherem Blut oder Knochenmark für eine Verdünnungsreihe vorhanden, sodass eine Quantifizierung nicht möglich ist. Darüber hinaus weisen klonale IGH-Genumlagerungen häufig eine hohe Frequenz somatischer Mutationen auf, welche die spezifische Primerbindung verhindern können und zu falsch negativen Ergebnissen führen können.

Aufgrund der großen prognostischen Bedeutung von MRD wäre es jedoch wünschenswert, möglichst viele Patienten mittels MRD-Diagnostik in klinischen Studien erfassen zu können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern eine IGH-basierte MRD-Erfassung unter Verwendung von klonspezifischen Plasmiden als Standard für die Quantifizierung bei Patienten mit FL valide, reproduzierbar und somit anwendbar ist.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmaterialien

2.1.1 Material und Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Name (Hersteller)</u>
DNA Extraktor	QuickGene 610-L (Autogene)
50, 15 und 10 ml Röhrchen	(Eppendorf)
Pipetten, Pipettenspitzen	(Eppendorf)
1,5 ml Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
Serologische 10 ml Pipetten	(Eppendorf)
Spektralphotometer	Nano-Drop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific)
Zentrifugen	Sorvall RT7 Plus (GMI), Heraeus Megafuge 1.0 (Kendro), Allegra (Beckman Coulter)
sterile 50 ml Röhrchen	(Sarstedt)
sterile 3 ml Pasteurpipetten	(Sarstedt)
sterile 13 ml Röhrchen	(Sarstedt)
Leucosep-Röhrchen	(Greiner)
Wasserbad	Haake F2 (Haake)
Vortexer	Vortex Genie (Scientific Industries)
25, 10 ml Stabpipette	(Sarstedt)
3,5 ml Transferpipetten	(Sarstedt)
Blutkörperchenzählgerät	KX-21N (Sysmex)
Thermo-Cycler	DNA Thermal Cycler 480 (PE Applied Biosystems)
Drehschüttler	(Heidolph Instruments)
PCR-Strip	(Sarstedt)
96-well-PCR-Platte	(Eppendorf)
Genescan-Sequenziergerät	ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Kapillar-Sequenziergerät	ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
Millipore-96-well Platte	Millipore Multiscreen PCR-Platte (Millipore)
Unterdruck-Absaugung	(Millipore)
Elektrophoresekammer	Model B1A (Easycast Owl Separationsystems)
Elektrophorese-Kämme	(Easycast Owl Separationsystems)

Elektrophorese-Gießrahmen	(Easycast Owl Separationsystems)
Wärmeschrank 60°C	(Memmert)
Mikrowelle	(Sharp)
Spannungsgeber	Power Supply (Bio-Rad)
Gel-Dokumentation	Universal Hood II, ChemiDoc EQ (Bio-Rad)
Thermostat-Wasserbad	Haake F2 (Haake)
Petrischalen	(Sarstedt)
1,5 ml Röhrchen	(Eppendorf)
Spatel	(Sarstedt)
Inkubator mit Schüttler	Thermoshake (Gerhardt)
Autoklav	Varioklav (HP)
Säulen-Absaugvorrichtung	(Promega)
0,5 ml Reaktionsgefäß	(Sarstedt)
Zentrifuge	Peqlab Perfect Spin P (Peqlab)
Optische 96-well Platten	(Sarstedt)
Optische Abdeckfolie	Optical cohesive covers (Applied Biosystems)
TaqMan™-Cycler	ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D (Eppendorf), Concentrator 5301 (Eppendorf)

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien, Bakterienzellen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Name (Hersteller)</u>
DNA-Extraktionskit	Fujifilm Quickgene DNA Whole Blood Kit L (Fuji)
Ethanol (>99 %)	(Merck)
Nuklease-freies Wasser	(Merck)
Ficoll-Lösung	Biocoll Separating Solution (Biochrom AG)
Buffy Coat-Extraktion	Mammalian Blood Kit (Roche)
RNase	(Roche)
PBS-Puffer	(Merck)
Aqua dest.	(Merck)
Taq-Polymerase	AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems)
PCR-Puffer	PCR Buffer II (Applied Biosystems)
Desoxynukleotide	dNTP's (Roth)
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ (Applied Biosystems)

POP 4	(Thermo Fisher Scientific)
ROX	(Thermo Fisher Scientific)
BigDye-Terminator v1.1	(Applied Biosystems)
5-fach Sequenzierpuffer	(Applied Biosystems)
Sepharose	(GE Healthcare)
HIDI-Formamid	(Thermo Fisher Scientific)
Agarose	PeqGold Universal Agarose (PEQLAB)
Interkalator	GelRED™ (Biotium)
DNA-Längenstandard	FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
Ladepuffer	10 X TBE, Glycerol, Bromphenolblau (Appli-Chem)
TE-Puffer	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure
Klonierungs-Kit	TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen)
Vektor	pCR™4-TOPO®-Vektor (Invitrogen)
Bakterienzellen	Invitrogen-One-Shot-TOP10 chemically competent E. coli (Invitrogen)
LB-Bouillon	LB-Broth, Miller Fertigpulver (Sigma-Aldrich)
S.O.C.-Medium	(Invitrogen)
Ampicillin	(Invitrogen)
Agar	(Sigma-Aldrich)
Glycerin	(Merck)
Plasmid-Präparation	Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)
Restriktionsenzyme	NcoI, BcII, FastDigest® Restriktionsenzyme (Thermo Fisher Scientific)
Puffer für Restriktionsverdau	10X FastDigest® Puffer (Thermo Fisher Scientific)
Plasmid-Aufreinigung	GenJet™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)
RQ-PCR-Master Mix plus	(Eurogentec)
TaqMan Univ. Master Mix	(Applied Biosystems)
Bovines Serum Albumin (BSA)	(Serva)

2.1.3 Software

<u>Bezeichnung</u>	<u>Name (Hersteller)</u>
Quantity One	(Bio-Rad)
GeneScan-Software™	(Applied Biosystems)
Sequenzier-Software	Sequencing Analysis (Applied Biosystems)
Alignment-Software	BioEdit (Ibis Biosciences), IMGT/V-Quest (The international immunogenetics information system)
Screenshots	Hover Snap, Screen Cap (Freeware)
Primerdesign	PrimerExpress, Oligo (Applied Biosystems)
Textverarbeitung, Darstellung, Statistik	Word & Excel 2010 (Microsoft), R (The R Foundation), R-Studio (R Studio)

2.2 Probenmaterialien

2.2.1 Patientenproben und Zelllinie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben aus peripherem Blut, Knochenmark und Stammzellpräparaten von Patienten mit FL untersucht. Zum einen waren dies Patienten, die im Rahmen der „GLSG 2000-Studie“ behandelt wurden (18 Patienten). Hierbei erhielten die Patienten entweder eine kombinierte Immunchemotherapie bestehend aus dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (R-CHOP) oder aber die Chemotherapie alleine (CHOP). In einer zweiten Randomisation erhielten die Patienten dann entweder eine konsolidierende Hochdosischemotherapie und anschließende autologe Stammzelltransplantation oder eine Interferon-Erhaltungstherapie (Hiddemann et al. 2005). Es lagen für diese Arbeit Proben bei Diagnosestellung, im Verlauf der Induktionschemotherapie, vor autologer Stammzelltransplantation (Stammzellpräparate), im Rahmen der Nachsorge sowie im Falle eines Rezidivs vor.

Zum anderen wurden DNA-Proben von Patienten analysiert, welche im Rahmen der „GADOLIN-Studie“ behandelt wurden (14 Patienten). Dabei handelt es sich um eine multizentrische, randomisierte, zweiarmige Phase-III-Studie zur Beurteilung von Obinutuzumab

plus Bendamustin gefolgt von Obinutuzumab allein für die Dauer von bis zu zwei Jahren im Vergleich zu Bendamustin allein bei Patienten mit indolentem rezidivierten bzw. refraktären Non-Hodgkin-Lymphom. Bislang lagen im Rahmen der Studiendiagnostik DNA-Proben zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten vor, bei Diagnosestellung (SCR, screening), an Tag 1 des 4. Chemotherapiezyklus (C4D1, cycle 4 day 1) und nach Abschluss der Induktionschemotherapie (EOI, end of induction).

Der Verwendung entnommener Materialien für molekulargenetische Untersuchungen hatten alle Patienten, im Rahmen der Aufklärung und informierten Patienteneinwilligung vor Einschluss in die Therapiestudien schriftlich zugestimmt, ein Ethikvotum für die jeweiligen Studien lag vor. Die experimentellen Arbeiten, einschließlich der Probenannahme und Erfassung, wurden im Labor für hämatologische Spezialdiagnostik, heute Hämatologie Labor Kiel, der Klinik für Innere Medizin II, UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

2.2.2 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA der Patientenproben erfolgte nach Standardprotokollen bzw. mittels automatisierter DNA-Extraktion. Abschließend erfolgte die Messung der DNA-Konzentration und Reinheit im Spektralphotometer. Die Konzentration einer DNA-Lösung kann photometrisch, bei einer Wellenlänge von 260 nm, anhand der Extinktion bestimmt werden. Dem liegt folgendes Verhältnis zu Grunde: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger (ds) DNA (bei pH 7,0). Die Angabe der Konzentration der DNA erfolgte in $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.3 IGH-PCR, Klonalitätsanalyse und Sequenzierung

2.3.1 FR1-IGH-PCR

Mit der IGH-PCR können klonal rearrangierte Immunglobulin-Schwerkettengene der B-Lymphozyten amplifiziert werden. Für diese Arbeit wurden die IGH-PCR-Assays und Primer des europäischen BIOMED-2-Projektes zur Detektion kompletter klonaler B-Zell-IGH-Rearrangements verwendet (van Dongen et al. 2003). Dabei handelt es sich um drei

Multiplex-PCR-Ansätze, mit denen unterschiedlich große Fragmente des IGH-Rearrangements, entsprechend der Vorwärtsprimer (FR1-, FR2-, FR3-Primer) amplifiziert werden. Die Bindungsregionen der Vorwärtsprimer liegen hierbei in konservierten Bereichen des VH-Gensegmentes (FR1-, FR2-, oder FR3-Regionen; engl. framework region) innerhalb des Immunglobulin-Schwerkettengens. Die drei IGH-PCR-Assays verwenden einen Mix aus 6 (FR1) bzw. je 7 (FR2 und FR3) verschiedenen Vorwärts-Primern, korrespondierend zu den jeweiligen VH-Gensegmentfamilien. Als Rückwärts-Primer dient in allen drei Fällen derselbe JHconsensus-Primer, welcher in einem konservierten Bereich des 3'-Endes aller 6 JH-Familien bindet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.1 wiedergegeben. Abbildung 2.1 zeigt schematisch ein IGH-Rearrangement sowie die Bindungsstellen der Primer.

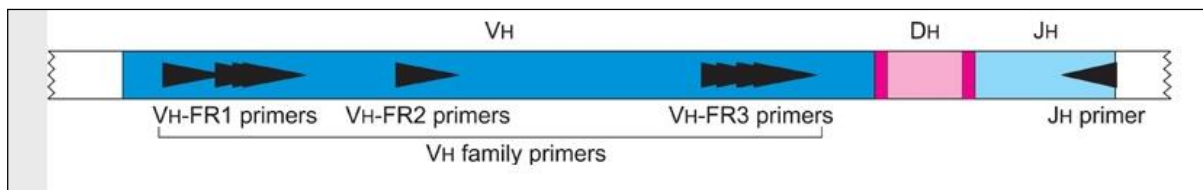


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung eines IGH-VDJ-Rearrangement mit Bindungsstellen der Gensegmentfamilien-spezifischen FR1-, FR2- und FR3-Primer sowie des JHconsensus-Primer; nach van Dongen et al. 2003

IGH-PCR	Orientierung	Primer	Primer-Sequenz
FR1	sense	FR1-VH1	5' - GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG-3'
	sense	FR1-VH2	5' - GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC-3'
	sense	FR1-VH3	5' - CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG-3'
	sense	FR1-VH4	5' - CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG-3'
	sense	FR1-VH5	5' - CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT-3'
	sense	FR1-VH6	5' - TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG-3'
	antisense	JHconsensus	5' - CTTACCTGAGGAGACGGTGACC-3'

Tabelle 2.1 Primersequenzen der FR1- und des JHconsensus-Primer, sense = Vorwärtsprimer, antisense = Rückwärtsprimer

In dieser Arbeit wurde die FR1-IGH-PCR zur Klonalitätsanalyse von Patienten mit FL verwendet, da diese die höchste Detektionsfrequenz aufweist (Evans et al. 2007). Klonale Amplifikate wurden im Verlauf sequenziert und die Sequenzinformation zur Herstellung patientenspezifischer IGH-Plasmide und Primer-Sonden-Systeme verwendet.

Es wurde für die IGH-PCR ein Mastermix, bestehend aus den jeweiligen Primern, PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP's, Aqua dest. sowie der Taq-Polymerase hergestellt und anschließend die entsprechende DNA-Probe hinzugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl und setzte sich wie in Tabelle 2.2 angegeben zusammen. Die Reaktionsbedingungen des Cycling sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	Menge pro Ansatz
FR1-Primermix (VH1-VH6)	100 µM (jeweils)	0,4 µM (jeweils)	0,1 µl (jeweils)
JH consensus-Primer	100 µM	0,4 µM	0,1 µl
PCR Puffer II	10x	1x	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3 µl
dNTPs	25 mM (jeweils)	0,2 mM (jeweils)	0,4 µl
AmpliTaq Gold	50 U/µl	1 U/Ansatz	0,2 µl
DNA			100 ng
Aqua dest.			ad 50 µl

Tabelle 2.2 Pipettieransatz der FR1-IGH-PCR

35 Zyklen	Initiale Denaturierung	94°C	10 min
	Denaturierung	94°C	60 sec
	Annealing	60°C	60 sec
	Elongation	72°C	30 sec
	Finale Elongation	72°C	30 min
	Lagerung	4°C	10 min

Tabelle 2.3 Cycling-Bedingungen der FR1-IGH-PCR

Als (klonale) Positiv-Kontrolle wurde genomische DNA der B-Zell-Lymphom-Zelllinie RAMOS und als polyklonale Kontrolle Buffy Coat-DNA (BC-DNA) verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente Aqua.

2.3.2 Klonalitätsanalyse der FR1-IGH-PCR-Produkte

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuremoleküle, anhand einer angelegten Spannung und entsprechend ihres polyanionischen Charakters, ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde die Agarose-Gelelektrophorese als Amplifikationskontrolle durchgeführt. Es wurden entweder 2 %-ige oder 1 %-ige Agarose-Gele verwendet. Um die DNA-Moleküle nach der Auftrennung sichtbar machen zu können wurden jeweils 50 ml Agarose 5 µl des interkalierenden Farbstoffs GelRED™ beigefügt, welcher unter UV-Licht fluoresziert. Nun wurden jeweils 8 µl der PCR-Produkte mit 2 µl eines Ladepuffers vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Längensstandard wurden 3 µl FastRuler DNA-Ladder in eine weitere Tasche pipettiert. Nachdem für 20 - 30 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt wurde, konnten nach erfolgter Auftrennung die Banden der PCR-Produkte unter einer UV-Kamera sichtbar gemacht werden.

Neben konventioneller Gel-Elektrophorese wurde in dieser Arbeit die GeneScan®-Fragmentlängenanalyse verwendet, welche die automatisierte und hochauflösende Auftrennung und Detektion von PCR-Produkten ermöglicht. Das Prinzip beruht auf der größenabhängigen elektrophoretischen Auftrennung von DNA in einer Polyacrylamidgel-Matrix, welche aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften eine schärfere Trennung ermöglicht als herkömmliche Agarosegele. Durch Fluoreszenzmarkierung der in der PCR verwendeten Primer ist es möglich, die PCR-Produkte automatisiert durch lasergestützte Kapillarsequenziergeräte zu detektieren. Trägt man gleichzeitig einen farblich differenz markierten Längensstandard auf, so ist eine bis auf 1 - 3 Basen genaue Fragmentlängenbestimmung möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die GeneScan®-Methode zur Klonalitätsanalyse der FR1-IGH-PCR-Produkte verwendet. Die IGH-PCR wurde hierfür mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Primern durchgeführt. Es handelte sich dabei um das Fluorophor FAM (6-Carboxyfluorescein). Als Längensstandard diente ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter

Basenpaarlänge, welche mit dem Fluorophor ROX (Carboxy-X-Rhodamine) markiert waren. Es wurden 1 µl eines jeden FR1-IGH-PCR-Amplifikates in ein Röhrchen mit je 12 µl Formamid und je 0,5 µl ROX gegeben. Die Proben wurden bei 95 °C für 2 Minuten denaturiert, dann sofort auf Eis kurz inkubiert und anschließend in dem DNA-Kapillarsequenziergerät separiert und analysiert. Es wurde der ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet, bei dem die PCR-Produkte im denaturierten Zustand durch polyacrylamidgelgefüllte Glaskapillaren aufgetrennt werden. Durch die automatisierte Detektion der laserinduzierten Fluoreszenz sowie die Fragmentlängenanalyse mit Hilfe des internen Längenstandards erhält man für jedes analysierte PCR-Produkt die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen gegen die Fragmentlänge auf der Abszisse. Im Falle eines klonalen PCR-Produktes erhält man einen Fluoreszenzpeak, im Gegensatz dazu zeigt das Elektropherogramm einer polyklonalen B-Zell-Population eine Längenverteilung entsprechend einer Normalverteilung.

2.3.3 Sequenzierung der FR1-IGH-PCR-Produkte

In der vorliegenden Arbeit diente die Sequenzierung der FR1-IGH-PCR-Produkte der exakten Identifizierung der klonalen VH-N-DH-N-JH-Region als Vorlage zum Design von allelspezifischen Oligonukleotid-Primern (ASO-Primer) und zur Auswahl geeigneter Konsensus-Sonden, in einzelnen Fällen auch zum Design von ASO-Sonden für die quantitative PCR und MRD-Bestimmung. Bei Nachweis eines klonalen IGH-Rearrangements in der GeneScan®-Analyse schloss sich direkt die Sequenzierung an. Der hierbei verwendeten Cycle-Sequenzierung liegt die Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger zu Grunde. Anders als bei der klassischen Sequenzierung, bei welcher die notwendigen DNA-Kopien in nur einem Zyklus generiert werden, geschieht dies bei der Cycle-Sequenzierung in mehreren Zyklen. Zur automatischen Sequenzanalyse erfolgt die Markierung der DNA durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide, sogenannte Dye-Terminatoren. Die Reaktion kann auf diese Weise in einem einzigen, statt in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt werden.

Um die IGH-PCR-Produkte von möglicherweise störenden Primern, dNTPs und inkompletten PCR-Fragmenten zu bereinigen, wurden sie zunächst über eine Millipore-Platte aufgereinigt. Hierzu wurden jeweils die gesamten 50 µl eines PCR-Ansatzes in ein Well der Millipore-Platte pipettiert und diese dann bei einem Unterdruck von 20 - 25 mmHg für 10 Minuten auf eine Absaugvorrichtung gestellt. Die getrockneten PCR-Produkte wurden anschließend durch Zugabe von 25 µl Aqua dest. und 10-minütiges Schütteln eluiert. Diese 25 µl aufgereinigtes und eluiertes PCR-Produkt wurden dann in frische Reaktionsgefäße überführt. 8 µl der aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2 %-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration der für die Sequenzierreaktion vorgesehenen PCR-Amplifikate wurde eine Low DNA MASS™ Ladder in dem Agarosegel verwendet. Für die Sequenzierreaktion wurden 10 - 20 ng des Ansatzes als Template, sowie der BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) verwendet. Ein Sequenzierreaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl sowie die Bedingungen des Cycling sind in Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 angegeben.

Reagenzien	Menge pro Ansatz
Big Dye Terminator v.1.1	1 µl
5 X Sequenzier-Puffer	7 µl
Primer (5 pmol/µl)	2 µl
PCR-Produkt	1 – 10 µl
Aqua dest.	ad 20 µl

Tabelle 2.4 Pipettieransatz der IGH-Sequenzierung

50 Zyklen	Initiale Denaturierung	96°C	5 min
	Denaturierung	96°C	10 sec
	Annealing	55°C	5 sec
	Elongation	60°C	4 min
	Lagerung	4°C	10 min

Tabelle 2.5 Cycling-Bedingungen IGH-Sequenzierung

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion wurden die Reaktionsprodukte über Sepharose-säulen aufgereinigt, um sie von überschüssigen Didesoxynukleotiden und Primern zu befreien. Anschließend wurden zu jeder Probe 10 µl HIDI-Formamid pipettiert um diese zu denaturieren. Nach der Aufreinigung erfolgte die automatisierte Detektion der Basenabfolge mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung und Laser-Fluoreszenzdetektion im ABI 3100 Sequencer. Im Anschluss wurden die erhaltenen IGH-Sequenzen mit der IMGT/V-Quest Referenz-Datenbank für das humane Immunglobulinen verglichen. So konnte genau ermittelt werden, welche V-, D,- und JH-Genfamilien für die jeweiligen IGH-Rearrangements der Patienten-/ Zelllinien-Proben Verwendung fanden. Ebenso konnten, durch den exakten Vergleich mit der Keimbahnsequenz des Immunglobulinen, Mutationen in den einzelnen Abschnitten der IGH-Rearrangements sowie Deletionen und Insertionen im Bereich der VH-(N)-DH-(N)-JH-Junktionsregion detektiert werden.

2.4 Erstellung von Plasmid-Standards für die RQ-PCR

2.4.1 Klonierung der IGH-PCR-Produkte

Zur Erstellung einer Plasmid-Standardkurve für die MRD-Quantifizierung mittels IGH-RQ-PCR wurde die jeweilige patientenspezifische IGH-Sequenz bzw. das IGH-PCR-Fragment in einen Plasmidvektor kloniert und zur Amplifikation in *E. coli*-Bakterien transfiziert. Die Ligation und die Transformation wurden entsprechend den Herstellerangaben des TOPO® TA Cloning® Kit durchgeführt, wobei in diesem Fall der pCR™4-TOPO®-Vektor zum Einsatz kam. Es wurde jeweils gerade so viel PCR-Produkt in die Ligationsreaktion eingesetzt, dass in etwa ein molares Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor von 3:1 vorlag. Zu 1 µl Salzlösung wurden also 0,5 - 4 µl PCR-Produkt pipettiert und mit Aqua auf 5 µl aufgefüllt. Dann wurde 1 µl Vektor hinzugefügt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transformation wurden daraufhin zunächst pro Patientenprobe ein Röhrchen One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 2 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen pipettiert. Nach Inkubation des Transformationsansatzes für 30 Minuten auf Eis folgte der Hitzeschock im

Wasserbad für 30 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Röhrchen sofort wieder in das Eisbad gestellt und pro Transformationsansatz 250 µl S.O.C.-Medium hinzupipettiert. Die Röhrchen wurden dann unter Schütteln für 1,5 - 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf vorbereitete LB-Agarplatten ausplattiert, pro Patientenprobe je eine Platte mit 50 µl und eine mit 100 µl Transformationsansatz. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnte das Wachstum der Bakterienkolonien beurteilt werden. Sofern die Kolonien gewachsen waren, wurden sie zur Plasmidpräparation sowie zur Sequenzierung und Herstellung der Plasmid-Standards gepickt. Die Präparation der Plasmide aus den Bakterienkulturen erfolgte, als sogenannte Säulen-Minipräparation, mit dem Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System entsprechend der Herstellerangabe.

2.4.2 M13-Sequenzierung der IGH-Plasmide

Die M13-Sequenzierung der IGH-Plasmide diente dem Zweck einer Erfolgskontrolle der erfolgreichen Klonierung der FR1-IGH-PCR-Produkte. Der Ansatz der M13-Sequenzierreaktion entspricht dem für die FR1-IGH-Sequenzierung, wobei immer 1 µl der jeweiligen Plasmid-Lösung eingesetzt wurde. Die Bedingungen des Cycling entsprachen ebenfalls denen der FR1-IGH-Sequenzierung. Die M13-Primer-Sequenzen sind in der Tabelle 2.6 angegeben.

Primer	Primer-Sequenz
M13-FP	5' - GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG-3'
M13-RP	5' - GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC-3'

Tabelle 2.6 Primer der M13-Sequenzierung, FP = Vorwärts-Primer (engl. forward primer), RP = Rückwärts-Primer (engl. reverse primer)

2.4.3 Restriktionsverdau und Aufreinigung der IGH-Plasmide

Im Anschluss an die Plasmidpräparation wurden die patientenspezifischen IGH-Plasmide mit Restriktionsenzymen linearisiert. Im Gegensatz zur Verwendung ringförmiger Plasmide als Standard für die RQ-PCR, liefert diese Methode zuverlässigere Ergebnisse (Gimenez et al. 2012). Es wurden die Enzyme NcoI und BclII als sogenannte FastDigest® Restriktionsenzyme verwendet. Für einen Reaktionsansatz wurden 2 µg Plasmid-DNA, 2 µl 10x FastDigest® Puffer und 2 µl FastDigest® Restriktionsenzym in ein Reaktionsgefäß pipetiert. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 20 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz gevortext und bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Zur Erfolgskontrolle des Restriktionsverdaus wurden die Reaktionsprodukte, gemeinsam mit einer GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für 60 - 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge der rekombinanten DNA-Moleküle betrug insgesamt ca. 4260 bis 4320 bp. Dies ergibt sich aus der Länge des pCR™4-TOPO®-Vektors von 3956 bp und der Länge des jeweiligen Inserts, in diesem Fall das mittels FR1-PCR generierte IGH-Rearrangement von 310 - 360 bp.

Anschließend wurden überschüssige Salze, Nukleotide und Enzyme mittels Aufreinigung mit dem GenJet™ PCR Purification Kit entfernt. Alle Arbeitsschritte der DNA-Aufreinigung wurden bei Raumtemperatur nach den Herstellerangaben des beiliegenden Protokolls durchgeführt.

2.4.4 Standardkurven aus IGH-Plasmiden

Zur Herstellung einer Plasmidlösung, und folglich einer Verdünnungsreihe mit bekannter Kopienzahl der Zielsequenz pro Verdünnung, wird zunächst die Masse eines rekombinanten Plasmids berechnet (1). Da jedes Plasmid genau 1 kloniertes IGH-Rearrangement enthält, entspricht die Menge an Plasmidkopien auch der Menge an Kopien dieser Zielsequenz. Im Folgenden sind die Berechnungen zur Erstellung einer Plasmid-Verdünnungsreihe exemplarisch für die Zelllinie RAMOS aufgeführt:

$$(1) \quad m [g] = n * (1,096 * 10^{21} \text{ g/bp})$$

Hierbei ist m = die Masse eines Plasmidmoleküls, n = die Anzahl der bp des Plasmids inklusive Insert, die Konstante $1,096 \cdot 10^{-21}$ g/bp ergibt sich aus der Avogadro-Konstante ($6,023 \cdot 10^{23}$ mol⁻¹) und der mittleren molaren Masse von Doppelstrang-DNA (660 g/mol/bp). Im vorliegenden Fall beträgt die Länge des Plasmids 3956 bp und die Länge des klonierten Inserts 340 bp (Länge des Produktes der FR1-IGH-PCR von RAMOS):

$$(1) \quad m [g] = (3956 \text{ bp} + 340 \text{ bp}) \cdot (1,096 \cdot 10^{-21} \text{ g/bp})$$

$$m = 4,71 \cdot 10^{-18} \text{ g}$$

Die Masse eines Plasmidmoleküls beträgt $4,71 \cdot 10^{-18}$ g. Die folgenden Berechnungen gehen von der Bedingung aus, dass in jede RQ-PCR-Reaktion der Verdünnungsstufen später genau 5 µl eingesetzt werden, welche die jeweils gewünschte IGH-Kopienzahl enthalten. Es sollen Verdünnungsstufen mit 100.000, 10.000, 1.000, 100, 50, 10, 5 und 1 Plasmidkopien für die Standardkurve hergestellt werden.

Im Folgenden Schritt (2) wird berechnet, welche Masse Plasmid notwendig ist, um die jeweils gewünschte Kopienzahl zu erhalten. Angabe beispielhaft für 100.000 Kopien:

$$(2) \quad 100.000 \text{ Kopien} \cdot 4,71 \cdot 10^{-18} \text{ g/Kopie} = 4,71 \cdot 10^{-13} \text{ g}$$

Im Folgenden Schritt (3) wird die Endkonzentration [g/µl] der Plasmid-DNA in den jeweiligen Verdünnungsstufen berechnet, indem die in (2) berechnete Plasmidmasse durch das Volumen dividiert wird, welches pro Reaktion in die RQ-PCR eingesetzt wird (definiert als 5 µl/Reaktion). Auch hier exemplarisch für die 100.000 Kopien-Verdünnung:

$$(3) \quad 4,71 \cdot 10^{-13} \text{ g} / 5 \mu\text{l} = 9,42 \cdot 10^{-14} \text{ g}/\mu\text{l}$$

Im Folgenden wird die Verdünnungsreihe pipettiert. Zunächst mussten zwei 1:100-Vorverdünnungen (Verdünnung A, B) der Plasmid-Stocklösungen erfolgen, um eine sinnvolle Plasmidkonzentration zu erreichen, aus der dann die jeweiligen Verdünnungsstufen pipettiert werden konnten. Die Konzentration der Lösung B betrug dann bei RAMOS $4,24 \cdot 10^{-12}$ g/µl. Es konnte nun nach der folgenden Formel (4) berechnet werden, welches Volumen aus der jeweiligen (vorherigen) Plasmid-Lösung in die 100.000-, 10.000-, 1.000-, usw.- Kopien-Verdünnung pipettiert werden musste:

$$(4) \quad C1 * V1 = C2 * V2$$

Hier exemplarisch die Berechnung für die 100.000 Kopien-Verdünnung:

$C1$ = Plasmid-Konzentration der Lösung B, aus der in die 100.000-Kopien-Verdünnung pipettiert werden soll, $V1$ = gesuchtes Volumen das aus B pipettiert werden muss, $C2$ = Plasmid-Endkonzentration in der zu erstellenden Verdünnung, $V2$ = Gesamtvolumen der zu erstellenden Verdünnung (hier mit 100 μl berechnet):

$$(4) \quad (4,24 * 10^{-12} \text{ g}/\mu\text{l}) * (V1) = (9,42 * 10^{-14} \text{ g}/\mu\text{l}) * (100 \mu\text{l})$$

$$V1 = 2,2 \mu\text{l}$$

Für die Herstellung der 100.000-Kopien Verdünnung müssen folglich 2,2 μl der Verdünnung B in ein Röhrchen pipettiert werden. Diese Plasmid-Lösung musste dann auf ein Endvolumen von 100 μl aufgefüllt werden, so dass in 5 μl hieraus genau 100.000 Plasmidkopien enthalten sind. Somit ergab sich die Notwendigkeit (100 μl - 2,2 μl = 97,8 μl) 97,8 μl Lösungsmittel hinzuzufügen. Um für die RQ-PCR der Plasmidverdünnungen Bedingungen zu schaffen, die annähernd denen bei Verwendung genomischer DNA entsprechen, wurde als Lösungsmittel ein Gemisch aus polyklonaler DNA, also Buffy Coat-DNA (BC-DNA), und TE-Puffer gewählt. Dieses Gemisch wurde anhand der gemessenen Ausgangskonzentration der BC-DNA so eingestellt, dass in jedem Reaktionsansatz der Verdünnungsstufen in der RQ-PCR (entsprechend den definierten 5 μl mit der zugehörigen Plasmid-Kopienzahl) genau 500 ng BC-DNA enthalten waren. Dies entspricht den Bedingungen der RQ-PCR der Verlaufspuren, da hierbei auch jeweils 500 ng DNA in die RQ-PCR eingesetzt werden. Es wurde dementsprechend eine BC-Konzentration von 100 ng/ μl eingestellt, bei einer Ausgangskonzentration der BC-DNA von 385 ng/ μl . Beispielsweise für die 100.000-Kopien-Verdünnung (Verdünnung-1): 100 μl (= $V2$) einer Lösung sollen 100 ng/ μl BC-DNA enthalten, also werden 100 μl * 100 ng/ μl = 10.000 ng BC-DNA benötigt. 10.000 ng aus einer Stocklösung mit 385 ng/ μl = 25,97 μl (pipettiert wurden 26,0 μl). Das heißt, für die 100.000 Kopien-Verdünnung werden zu 26,0 μl BC-DNA 71,8 μl TE-Puffer (entsprechend der oben berechneten Menge an Lösungsmittel insgesamt von 97,8 μl) und hierzu die berechnete Menge, also 2,2 μl Plasmid-Lösung aus B pipettiert. In den weiteren Verdünnungsstufen

war dies je nach berechnetem Volumen V1 anzupassen. Es musste nach jeder Verdünnung gevortext werden und die DNA anschließend ca. 15 Minuten quellen, bevor hieraus die nächste Verdünnungsstufe pipettiert wird. Die fertigen Verdünnungsreihen wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Eine Verdünnungsreihe sollte nur einmal, bei Verwendung, aufgetaut und anschließend verworfen werden.

In der Tabelle 2.4 ist ein Pipettierschema zur Herstellung einer Plasmid-Verdünnungsreihe exemplarisch am Beispiel der Zelllinie RAMOS dargestellt. Analog hierzu wurden, je nach Ausgangskonzentration der linearisierten und aufgereinigten Plasmid-Lösungen, die Verdünnungsreihen für die Patienten hergestellt.

Plasmid-Kopien	Verd.-Nr.	Ursprung der Plasmid-DNA	Initiale Konz. Plasmid-DNA [g/μl] = C1	Volumen Plasmid-DNA [μl] = V1	Gesamtvolumen Lösungsmittel [μl]	Volumen BC-DNA [μl]	Volumen TE-Puffer [μl]	Endvolumen [μl] = V2	Endkonz. Plasmid-DNA [g/μl] = C2
k.A.	A	Stock-Lsg.	4,24E-08	10,0	990,0	0,0	990,0	1000,0	4,24E-10
k.A.	B	A	4,24E-10	10,0	990,0	0,0	990,0	1000,0	4,24E-12
100.000	1	B	4,24E-12	2,2	97,8	26,0	71,8	100,0	9,42E-14
10.000	2	1	9,42E-14	10,0	90,0	26,0	64,0	100,0	9,42E-15
1.000	3	2	9,42E-15	10,0	90,0	26,0	64,0	100,0	9,42E-16
100	4	3	9,42E-16	10,0	90,0	26,0	64,0	100,0	9,42E-17
50	5	4	9,42E-17	50,0	50,0	26,0	24,0	100,0	4,71E-17
10	6	5	4,71E-17	20,0	80,0	26,0	54,0	100,0	9,42E-18
5	7	6	9,42E-18	50,0	50,0	26,0	24,0	100,0	4,71E-18
1	8	7	4,71E-18	20,0	80,0	26,0	54,0	100,0	9,42E-19

Tabelle 2.4 Pipettierschema zur Herstellung der Plasmid-Verdünnungsreihe der Zelllinie RAMOS; Konzentration der Stocklösung = 42,4 ng/μl; C1 = Konzentration der DNA-Ausgangslösung, aus der in die nächste Verdünnungsstufe pipettiert wird; V1 = Volumen, welches aus der jew. Verdünnungsstufe in die nächste pipettiert werden muss; V2 = End-/ Gesamtvolumen der zu pipettierenden Verdünnungsstufe; C2 = Endkonzentration der Plasmid-DNA in der jew. Verdünnungsstufe, entsprechend der gewünschten Kopienzahl; Verdünnungen A und B = Vorverdünnungen (k.A. = keine Angabe der Plasmid-Kopien)

2.5 Quantitative Real-Time IGH-PCR (IGH-RQ-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (RQ-PCR) ist eine Methode der *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Echtzeit-Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen

am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt, wobei die proportionale Zunahme der Fluoreszenz mit der Menge an entstandenen PCR-Produkten die Quantifizierung möglich macht. Hierbei bedient man sich für die RQ-PCR einer Sonde, die an einem Ende mit einem sog. Quencher-, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert ist (Double-Dye-Oligos, TaqMan®-Sonde). Die relative Nähe des Quencher- zum Reporter-Farbstoff unterdrückt bei intakter Sonde dessen Fluoreszenz. Zudem ist das 3'-Ende der Sonde über einen Phosphatrest blockiert, so dass sie während der PCR nicht als dritter Primer fungieren kann. Während der Primerextension durch die Taq-Polymerase, trifft diese auf die spezifisch gebundene Sonde, hebt sie einige Basen von der DNA-Matrize ab und schafft so ein Substrat für ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Die Sonde wird nun zwischen Reporter und Quencher verdaut, der beschriebene Quenching-Effekt ist nun aufgehoben und die Emission des Reporters ist im Luminometer nachweisbar. Die Glasfaseroptik des ABI PRISM™ 7700 erlaubt eine Online-Messung der freigesetzten Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus. Die Sequence Detection Software SDS (Perkin Elmer Biosystems) berechnet die durchschnittliche Fluoreszenzzunahme (R_n) während jedes Zyklus und trägt sie gegen die Zykluszahl der PCR auf. Diese Berechnung erlaubt die Festlegung eines Schwellenwertes (Cycle Threshold, CT), bei dem die Fluoreszenz eine definierte Grundlinie überschreitet. Der Zeitpunkt zu dem diese Grundlinie durch die spezifischen PCR-Amplifikate überschritten wird, hängt von der ursprünglichen Kopienzahl im Reaktionsgefäß ab. Der CT-Wert wird also durch die Startkopienzahl der Zielsequenz bestimmt. Durch den Vergleich von CT-Werten der Verlaufspalten eines Patienten mit denen einer Standardkurve seines diagnostischen Materials, bei der die Startkopienzahl jeder Verdünnungsstufe bekannt ist, erfolgt die Quantifizierung. Die graphische Darstellung erfolgt über Amplifikationsdarstellungen, bei denen die Fluoreszenzzunahme (ΔR_n) gegen den PCR-Zyklus aufgetragen wird.

2.5.1 Primer und Sonden für die IGH-RQ-PCR

Für die Verwendung der RQ-PCR zur Quantifizierung von MRD wird bei lymphatischen Neoplasien eine allelspezifische PCR (ASO-PCR) durchgeführt, wobei in der Regel ein allelspezifischer Vorwärtsprimer in der VH-N-DH-N-JH-Region platziert wird und für die quantitative Erfassung klonaler B-Zellen ein JH-familienpezifischer reverser Primer und eine Konsensus-JH-Sonde eingesetzt wird. Somit kann eine klonspezifische RQ-PCR mit hoher Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden. Bedingt durch die relative Kürze des spezifischen junktionalen Bereichs bestehen nur wenig Möglichkeiten in der Variation des allelspezifischen Primers.

Die Grundlage für die klonspezifischen Primer waren die durch die Cycle-Sequenzierung gewonnenen Sequenzen der IGH-Rearrangements. Bei folliculären Lymphomen ist es aufgrund der hohen Mutationsfrequenz häufig nicht möglich, Konsensus-Sonden zu verwenden. Daher wurde die RQ-PCR Strategie dahingehend modifiziert, dass der Rückwärtsprimer, als ASO-Primer in die CDR3-Region gelegt wurde und der Vorwärtsprimer, ebenfalls als ASO-Primer, in den Bereich der FR2-Region platziert wurde. Um die größtmögliche Spezifität der gewählten RQ-PCR-Strategie zu erreichen, sollte die TaqMan™-Sonde auf demselben Strang binden wie der CDR3-ASO-Primer, also auf dem Antisense-Strang. Es wurden, sofern dies möglich war, Konsensussonden verwendet, welche in der FR3-Region des V-Segmentes binden, also in möglichst unmittelbarer Nähe zum CDR3-ASO (Ladetto et al. 2000). Bei Vorliegen von mehr als zwei Mismatches, oder bei Mismatches in den ersten drei Basen am 5'-Ende der Sonde, wurden patientenspezifische ASO-Sonden designt und verwendet.

Für das Design der jeweiligen ASO-Primerpaare, gemeinsam mit den Konsensus- bzw. ASO-Sonden, wurden die Primer Express Software 2.0 und das Programm Oligo 6.3 verwendet. Die Auswahl erfolgte nach Kriterien, die u.a. die Bildung von möglichen Sekundärstrukturen und Dimerbildungen zwischen den Oligonukleotiden berücksichtigt, welche die Effizienz der PCR-Reaktion beeinträchtigen würden:

- Die Zielsequenz sollte 50 - 150 bp lang sein

- Eine optimale Primerlänge beträgt ca. 20 Basen
- Die TaqManTM-Sonden sollten so kurz wie möglich sein, nicht jedoch kürzer als 13 Basen
- 4 oder mehr G-Nukleotide in Folge sollten vermieden werden
- Kein G am 5`-Ende der Sonde
- Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer sollten 10°C unter der T_m der Sonde liegen, etwa bei 58 - 60 °C, wobei die T_m der beiden Primer nicht um mehr als 1 °C voneinander abweichen sollten
- Der G/C-Gehalt sollte 30-80 % betragen
- Bindungsenergien von -3,5 kcal/ mol sollten nicht überschritten werden, vor allem nicht am 3`-Ende der Patienten-spezifischen Primer
- Die ASO-Primer sollte am 3`-Ende einen möglichst geringen G/C-Gehalt aufweisen

Auf diese Weise wurde für jeden Patienten und die Zelllinie ein Primer-Sonden-System designt/ ausgewählt und anschließend getestet. Ggf. musste, bei negativer Testung, gemäß unten aufgeführter Kriterien, ein weiteres Primer-Sonden-System designt und erneut getestet werden.

2.5.2 Reaktionsbedingungen der IGH-RQ-PCR

Der eigentlichen Verlaufsquantifizierung der Patientenproben war jeweils eine RQ-PCR des zugehörigen Primärmaterials mit den ASO-Primern sowie der Konsensus-Sonde, bzw. der ASO-Sonde als Primertest vorgeschaltet. Der Ansatz enthielt zudem als Negativkontrolle polyklonale DNA. Gleichzeitig wurde hierbei die optimale Annealing Temperatur ausgetestet. Begonnen wurde bei einer Annealing-Temperatur von 59°C, einer Sondenkonzentration von 100 nM und einer Primerkonzentration von 300 nM. Blieb die polyklonale DNA negativ wurde die Annealing-Temperatur beibehalten. War dies nicht der Fall, wurde versucht unter erhöhter Temperaturführung während des Annealing bei 61°C eine höhere Spezifität der Primerbindung an die Zielsequenzen zu gewährleisten.

Für die eigentliche IGH-RQ-PCR wurde zunächst ein Vormastermix hergestellt, indem pro Ansatz zu 12,5 µl des RQ-PCR-Puffers 0,38 µl sowohl des Vorwärts- als auch des Rückwärts-Primers, 0,13 µl der Sonde und 0,2 µl BSA in ein Gesamtvolumen von dann 13,59 µl pipettiert wurden. Es wurden dann diese 13,59 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pro Ansatz genau 500 ng DNA hinzupipettiert und mit Aqua auf ein Gesamt-Reaktionsvolumen von 25 µl aufgefüllt. Bei der DNA handelte es sich um die jeweilige Patienten-DNA-Probe. Im Falle der IGH-RQ-PCR der Plasmid-Verdünnungsreihen zur Erstellung der Standardkurve wurde die Menge DNA eingesetzt, welche für die jeweilige Kopienzahl benötigt wurde und mit BC-DNA aufgefüllt um auch hier eine Gesamt-DNA-Menge von 500 ng pro Reaktion einzusetzen. Der Reaktionsansatz von 25 µl wurde dann gevortext und in die RQ-PCR-Platte überführt, zentrifugiert und anschließend in das TaqMan-Gerät eingesetzt. Einen Reaktionsansatz der IGH-RQ-PCR sowie die Bedingungen des Cycling zeigen Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8.

Reagenzien	Stammkonzentration	Endkonzentration	Menge pro Ansatz
RQ-PCR-Puffer	5X	1X	12,5 µl
ASO-VP	20 µM	300 nM	0,38 µl
ASO-RP	20 µM	300 nM	0,38 µl
(ASO-) Sonde	20 µM	100 nM	0,13 µl
BSA	25 mM (jew.)	0,2 mM (jew.)	0,2 µl
DNA			500 ng
Aqua dest.			ad 25 µl

Tabelle 2.7 Pipettieransatz der IGH-RQ-PCR; ASO = allelspezifisches Oligonukleotid, VP = Vorwärtsprimer, RP = Rückwärtsprimer, BSA = Bovines Serumalbumin

UNG-Verdau	50°C	2 min
initiale Denaturierung	95°C	10 min
50 Zyklen	95°C	30 sec
	63°C	1 min

Tabelle 2.8 Cycling-Bedingungen der IGH-RQ-PCR

2.5.3 Standardkurven aus genomischer DNA

Es sollten zur MRD-Quantifizierung der Patienten-Verlaufspuren sowohl die im Rahmen dieser Arbeit zu etablierenden und zuvor beschriebenen IGH-Plasmid-Standardkurven als auch vergleichend Standardkurven aus genomischer DNA der Primärmaterialien verwendet werden. Die Quantifizierung der Verlaufspuren eines Patienten erfolgt über den Vergleich der Kopienzahl der jeweiligen Probe mit einer Standardkurve, die durch serielle Verdünnung des Primärmaterials bei bekannter Kopienzahl erstellt wurde. Grundlage der Berechnungen bildet die Kalkulation, dass 500 ng DNA aus 75000 menschlichen Zellen gewonnen wird, somit also 75000 diploiden Genomen entspricht. Unter der Annahme einer annähernd 100 %-igen Infiltration des Primärmaterials durch das Lymphom ergeben 500 ng dieses Ausgangsmaterials seriell von 10^0 auf 10^{-1} , 10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} und 10^{-5} verdünnt beispielsweise ein Äquivalent von 75000, 7500, 750, 345, 75, 34,5, 7,5 und 0,75 Zellen. Die Gesamt-DNA-Menge wird mit polyklonaler DNA auf 500 ng konstant gehalten.

2.5.4 RQ-PCR von Patientenproben im Krankheitsverlauf

Für eine MRD-Verlaufsbestimmung eines Patienten wurde die entsprechende Verdünnungsreihe des diagnostischen Materials in Dreifachansätzen, das Primärmaterial selbst, die Verlaufspuren sowie polyklonale DNA als Negativkontrolle im Fünffachansatz parallel eingesetzt. Die Auswertung erfolgt mit der Sequence Detection Software. In einem Amplification Plot wird der Anstieg der Fluoreszenz (ΔR_n), definiert als Fluoreszenz (R_n) minus dem Hintergrundsignal der ersten 15 Zyklen der PCR, logarithmisch auf der Ordinate gegen die Zykluszahl aufgetragen. Der Schwellenzyklus (Cycle Threshold, CT-Wert) einer

Probe ist als der PCR-Zyklus definiert, an dem eine signifikante Zunahme der ΔR_n zu beobachten ist. Die bekannte Startkopienzahl definiert die CT-Werte der Verdünnungsstufen der Standardkurve. Diese Werte erlauben über die CT-Werte der Verlaufsmaterialien deren Startkopienzahl zu berechnen. Je genauer die CT-Werte der Dreifachbestimmungen beieinander liegen, desto höher ist der Korrelationskoeffizient und umso genauer kann die Quantifizierung erfolgen. Die Sensitivität eines Assays wird anhand der letzten Verdünnungsstufe der Standardkurve bestimmt, die noch ein spezifisches PCR-Signal zeigt.

2.5.5 Albumin-RQ-PCR als interner Standard

Um die Integrität der DNA der einzelnen Proben zu verifizieren und um Unterschiede in Menge und Qualität der DNA bestimmen zu können, erfolgte parallel zu der Verlaufsquantifizierung als interne Referenz eine Quantifizierung des Albumingens. Die Sequenzen der Sonde und der Primer wurden von Pongers-Willemse et al. übernommen (Pongers-Willemse et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde für jedes Primär- und Verlaufsmaterial und die Zelllinie die Albumin-Kopienzahl/ 500 ng DNA mittels Albumin-RQ-PCR bestimmt. Dies erfolgte über einen Quantifizierungs-Standard aus einer seriellen Verdünnungsreihe von 500 ng Buffy Coat-DNA in TE-Puffer. Der Pipettieransatz für die Verdünnungsreihe und die Patientenproben, sowie die Reaktionsbedingungen der RQ-PCR sind in Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10 aufgeführt.

Reagenzien	Konzentration	Menge pro Ansatz
RQ-PCR-Puffer	1 X	12,5 μ l
VP 5´-CTGGAAGTCGATGAAACATACGTT-3´	20 pmol/ μ l	7,5 pmol
RP 5´-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATA-3´	20 pmol/ μ l	7,5 pmol
Sonde 5´-TGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGA-3´	20 pmol/ μ l	5 pmol
DNA		500 ng
Aqua dest.		ad 25 μ l

Tabelle 2.9 Pipettieransatz der Albumin-RQ-PCR, VP = Vorwärts-Primer, RP = Rückwärtsprimer

UNG-Verdau	50°C	2 min
initiale Denaturierung	95°C	10 min
45 - 50 Zyklen	95°C	15 sec
	58°C	1 min

Tabelle 2.10 Cycling-Bedingungen der Albumin-RQ-PCR

2.5.6 IGH-RQ-PCR anhand klonspezifischer Plasmid-Standards

In einem ersten Schritt sollte die Quantifizierung anhand der IGH-Plasmid-Standards bei der Lymphom-Zelllinie RAMOS auf ihre Genauigkeit geprüft werden. Hierzu wurde anhand des IGH-Plasmid-Standards, mit den Verdünnungsstufen 100.000, 10.000, 1.000, 100, 50, 10, 5 und 1 Plasmid/ -IGH-Kopie, eine Verdünnungsreihe aus genomischer DNA (gDNA) der Zelllinie RAMOS quantifiziert. Die gDNA-Verdünnungsreihe wurde als serielle 10-fach Verdünnung mit drei zusätzlichen 2-fach-Verdünnungsstufen hergestellt. Die Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} , $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-5}$ und 10^{-5} entsprechen hierbei theoretisch 10.000, 1.000, 500, 100, 50, 10, 5 und 1 IGH-Kopien. Dies folgt der Kalkulation, dass 666 ng DNA äquivalent zu etwa 100.000 diploiden Genomen und somit auch 100.000 IGH-Kopien sind. Bei der Zelllinie RAMOS handelt es sich um eine klonale B-Zell-Population und somit, bezogen auf das klonale IGH-Rearrangement, um eine Probe mit 100 %igem Tumorzellgehalt. Es wurde der RAMOS-gDNA jeweils polyklonale BC-DNA zugesetzt, um analog zu den Plasmid-Standards, insgesamt jeweils 500 ng DNA pro PCR-Reaktion einzusetzen.

In einem zweiten Schritt sollte die Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit der IGH-Plasmid-Standards an Materialien von Patienten mit FL untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Primär- und Verlaufsmaterialien von 24 Patienten (insgesamt 109 DNA-Proben) anhand der jeweiligen patientenspezifischen IGH-Plasmid-Standards quantifiziert.

2.6 Statistische Auswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten und Messwerte wurden mittels kommerzieller (Microsoft Excel 2007) und „Open-Source-“ (R, R-Studio) Software statistisch analysiert. Hierbei kamen gängige statistische Methoden und Parameter, wie Minima und Maxima, Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen zur Anwendung. Im Falle nicht normalverteilter Messwerte/ Variablen (nach Kolmogorow-Smirnoff-Test), wie den Charakteristika der Standardkurven, wurde der Wilcoxon-Test angewendet und ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant erachtet. Sollten Korrelationen zweier Variablen untersucht werden, so wurde im Falle eines linearen Zusammenhanges der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonalitätsanalyse der IGH-PCR-Produkte

Die Amplifikation der Immunglobulin-Schwerkettengenumlagerungen mittels FR1-IGH-PCR wurde an insgesamt 117 DNA-Proben von Patienten mit FL ($n = 32$), darunter sowohl primärdiagnostische Materialien als auch Verlaufspuren, und der Zelllinie RAMOS durchgeführt. Bei den primärdiagnostischen Materialien der Patienten konnte in 27/32 Fällen (84 %) eine eindeutige klonale Bande in der Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden. Die Banden der Patientenproben und der Kontrollen (RAMOS und Buffy Coat) lagen in der nachfolgenden Genescan-Analyse in dem zu erwartenden Größenbereich zwischen 310 - 360 Basenpaaren, im Falle von RAMOS bei 340 bp. Hierbei zeigte sich in 2/32 Fällen nur ein schwaches Signal mit polyklonalem Charakter und in 3/32 Fällen war lediglich ein „Rauschen“ erhältlich, wie es im Falle einer nicht erfolgreichen der PCR-Amplifikation zu sehen ist. In diesen 5/32 Fällen ließ sich auch im wiederholten Ansatz, trotz des zuvor im Rahmen der Studiendiagnostik erbrachten Nachweises einer FR1-Klonalität, kein klonales Signal generieren, weshalb sie den weiteren Analysen nicht zugeführt werden konnten.

Bei den klonalen primären Patientenproben ($n = 27$) und der Zelllinie wurde eine Direktsequenzierung durchgeführt. Hierbei ließen sich für alle 27/27 Proben und die Zelllinie auswertbare Chromatogramme generieren, aus denen die Sequenz des rearrangierten IGH-Gens als Basenabfolge abgelesen und analysiert werden konnte. Die Sequenzen der klonalen IGH-Rearrangements wurden mit einer Internet-Datenbank für das humane Immunglobulinen („IMGT“, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org>, zuletzt überarbeitet 27.08.2015) analysiert (Giudicelli et al. 2011). Auf diese Weise konnten die V-, D- und JH-Gensegmente der jeweiligen B-Zell-Klone, bzw. deren Gensegment-Familienzugehörigkeit und die Sequenz der hochspezifischen CDR3-Region bestimmt werden. In der Tabelle 3.1 sind die Gensegmentfamilien der jeweiligen klonalen IGH-Rearrangements (V-, D-, und JH), die Sequenzen der spezifischen CDR3-Region mit eventuellen Insertionen und Deletionen im Junctionsbereich, sowie bei

24 (UPN 1-24) von 27 Patienten und der Zelllinie RAMOS die Position der ASO-Rückwärtsprimer für die IGH-RQ-PCR dargestellt. In 3 Fällen (UPN 25-27) konnte in der Folge kein IGH-Plasmid zur weiteren Analyse hergestellt werden. Ebenfalls sind in der Tabelle 3.1 die Mutationsfrequenzen der VH-Gensegmente aufgelistet. Es zeigte sich hierbei für alle analysierten Patienten im Mittel eine Mutationsfrequenz von 10,7 % (Min. 0,5 %, Max. 21,2 %), was im Einklang mit bisher publizierten Daten steht (Aarts et al. 2000; Berget et al. 2015). Aufgrund der hohen Mutationsfrequenz in der IGHV-Region wurden für die IGH-RQ-PCR im Verlauf dieser Arbeit neben den patientenspezifischen reversen Primern in der CDR3-Region auch patientenspezifische Vorwärts-Primer in der FR2-Region und in einigen Fällen auch patientenspezifische Sonden in der FR3-Region (ASO-Primer und -Sonden) des IGHV verwendet. Die Abbildung 3.1 zeigt die in dem untersuchten Patientenkollektiv für die klonalen IGH-Rearrangements verwendeten IGHV-Gensegmente, bzw. deren prozentuale Häufigkeiten sowie die dabei detektierten mittleren Mutationsfrequenzen. Die Abbildung 3.2 zeigt die Häufigkeiten der einzelnen Gensegmentfamilien des IGHV. Es zeigt sich, dass im Gegensatz zu polyklonalen B-Zellen eine präferentielle IGHV-Gensegmentverwendung bei Patienten mit FL nachweisbar ist. Am häufigsten wurde das VH3-Segment verwendet, hierbei vorrangig VH3-11 und VH3-23, gefolgt vom VH4-Segment, vorrangig VH4-34 und dem VH1-Segment. Diese Daten stehen in Einklang mit Angaben in der Literatur und begründen sich in der Tatsache, dass beim folliculären Lymphom eine antigenabhängige Proliferation des malignen Klons nachweisbar ist (Stamatopoulos et al. 2000). Die Mutationsfrequenzen der IGHV-Gensegmenten unterschieden sich hierbei nicht signifikant.

UPN	IGH-Rearrangement			IG-VH Sequenz*	DEL	N1	DEL	IG-DH Sequenz*	DEL	N2	DEL	IG-JH Sequenz*	Mutationsfrequenz VH-Segment [%]
	VH	DH	JH										
1	VH3-11	DH5-18	JH4	CCATTATTACTGTGGAG <u>A</u>	-2		-7	<u>GATCAAGGG</u>	-4		-2	<u>TACTTTCAGTTFGG</u> GGCCA	8,1
2	VH3-23	DH2-15	JH3	GCCATATTACT <u>TACGAA</u>	-3	CTA	-18	<u>TAGGGAAATTC</u>	0	AGAC	-2	AGACATGGCTTGATGTCTG	15,1
3	VH3-11	DH3-9	JH4	CACGGCCGATATTATTGG	-7	TGGGGTCTCT <u>INTTGG</u>	-15	<u>GACGGTATTA</u>	-4	CONT	-13	<u>CTGGGGGGGGAA</u> CCCTGG	5,5
4	VH4-34	DH5-24	JH4	CTGTCTATTATTGTGGGGA	-2	AGGG	-2	<u>AGAGATGGTACAAT</u>	-2	GGG	-7	<u>TGACTCTGGGGC</u> AGGGAA	10,1
5	VH3-48	DH4-23	JH4	GTGTATTACTGTGGAG <u>AGA</u>	0	GGGG	-4	<u>TACGGTGGTAAC</u> T	-1	GGGGGGGTCAAA	-5	TTTGACTGTGGGGCAGGG	8,4
6	VH4-34	DH6-19	JH4	GGCTGTTATTACTGTGG <u>GA</u>	-4	<u>CTCTGGAGAGGGA</u>	-8	<u>CAGTGGCTGG</u>	-3	COGGT	-5	TTAGGACTGGGGCCAGG	6,2
7	VH3-21	DH7-27	JH3	ATG <u>TATTTCTGTGCA</u> AAAG	0	G	-5	<u>TGGGGA</u>	0	C	-14	TCTGGGGCAAGGGACAATG	9,3
8	VH1-18	DH5-24	JH4	CCTGTATTATT <u>TACGAG</u>	-1	CHGG	-3	<u>GAGAGTATAC</u>	-6	GGCCCAA	-5	TTTGACTGTGGGGCAGGG	11,0
9	VH3-23	DH2-21	JH4	CAGATATTATTGTGGAAAG	-1	GGGGG	-13	<u>GGAGARGCTTTTC</u>	0	CATTT	-5	<u>TTTGACTCTGGGGC</u> AGGG	14,8
10	VH3-11	DH3-3	JH6	CGTCTATTATTGTGGAGAG	-1	T	-5	<u>ACGATTT</u>	-18	<u>CGGACTTGATTTCTCTCT</u>	-21	<u>TGGACTCTGGGGC</u> AAAGG	12,3
11	VH3-23	DH5-18	JH4	TTATATTATTGTGGAAAG <u>A</u>	0	ATDGC	-10	<u>CTATGG</u>	-4	GGCTTGG	-15	GGGGTCAGGGAAACCTGTC	10,2
12	VH3-74	DH1-26	JH3	CTGTGTATTATTGTGGAA <u>GA</u>	-2	TCT	-7	<u>TGGTGTCTA</u>	-4	A	0	<u>TGATTTTT</u> TGATATCTGG	7,2
13	VH4-39	DH3-10	JH4	CTATTATTACTGTGGGGA	-2	ACGAG	-7	<u>TACGATCGAGGAA</u> TAA	-7	<u>ATGGTGT</u>	-5	<u>TTTGACTATGG</u> GGGGGA	15,9
14	VH3-33	DH3-16	JH4	GTCTTACTGTGGAG <u>AGA</u>	0	<u>TCAGTGGG</u>	-7	<u>GATAAGTTFGGGG</u> ACTTATG	-7	ACCA	-6	TTGAATACTGGGGCAGGGA	13,5
15	VH4-34	DH6-19	JH6	CTGTATTATTGTGGAGAG	-2	AAC	-6	<u>AGTAGTCACTGGGAC</u>	0	CACGTGGT	-11	TACCACATGGAAGCTCTG	5,9
16	VH4-38	DH6-19	JH5	CCCTCTATTATTGTGGAGAG	-2	<u>NTAGGGCA</u>	0	GGGGATGOCAGT	-9	TGGCCTTCT	0	ACAACCTGGTGGCCCTGG	11,7
17	VH3-48	DH3-10	JH4	TCTTACTATTGTGTAAGAG	-1	<u>GGACGATAA</u>	-2	ATGACATTGCTC	-16	TTTT	-5	TTTGACTGTGGGGCAGGG	10,4
18	VH4-59	DH1-1	JH4	CCATATTATTGTGGC <u>AGA</u>	-2	ATTT	-4	<u>CAAGTGGAC</u>	-3	-	-4	CTTTGACTGTGGGGCAGG	15,5
19	VH4-61	DH3-16	JH4	GGCCTTATTATTGTGGAG	-3	-	-21	<u>GAGTAACACTCTA</u>	-2	<u>ATTTTTTC</u>	-8	<u>GACTTTGGGGC</u> CAGGGAAA	21,2
20	VH1-2	DH4-17	JH3	CGTGTATTACTGTGGAGAG	-1	GGGGCTCTGATCCCTATTTA	0	<u>TGACTAGGTGAC</u> TAC	0	<u>GGGAGGTGGA</u>	0	<u>TGATCTTT</u> TGATATCTGG	0,5
21	VH3-23	DH3-16	JH3	GGCCTATTACTGTGGAA	-3	TAAT	-13	<u>GTTTGGAGAATTATCT</u>	-6	<u>GAAGT</u>	-6	<u>TTTGAATCTGG</u> GGCAAG	11,9
22	VH3-21	DH2-2	JH6	GTGTATTACTGTGGAG <u>AGA</u>	0	-	-17	<u>CCAG</u>	-10	A	-15	<u>ACGGTATGGAGT</u> TGGGGC	2,4
23	VH1-2	DH5-18	JH4	GGCATTATTCTGTCT <u>GTA</u>	-4	CAA	-4	<u>ATTTNTTAAGG</u>	-4	G	-7	<u>TGGT</u> ATTGGGGCAGGGAA	11,4
24	VH4-34	DH5-18	JH3	CTTTATATTTTCTAGGAGAG	-2	GG	-6	<u>ACCCCTATGG</u>	-4	<u>CTGTTTATGGAG</u> CAG	0	TGTTCTTTTGTATGTCTGG	9,8
25	VH3-11	DH1-7	JH3	CATATACTCTGTGGCCGAG	-1	CTTC	-4	TATAATTGACACTAC	0	AAAAAGAGGCACGGGGCTC	-8	TTGATCTTTGGGGCAGGG	19,1
26	VH4-39	DH3-10	JH4	TGTATTACTGTGGAGAGAT	0	TGGTC	-9	<u>TGTTTCAGGGAGT</u>	-8	TCTT	-9	ACTACTGGGGCAGGGAAAC	9,4
27	VH3-48	DH3-9	JH3	GGCTATCTATTCTGTGGGA	-4	CAAA	-4	<u>TACCTGTTTT</u>	-16	CCTATGGC	-4	GCTTTGATATTGGGGCCA	13,2
RAMOS	VH4-34	DH3-10	JH6	TGTGTATTACTGTGGAGAG	-1	T	-1	<u>TATTAATAGGG</u>	-19	<u>CGACTGTCG</u> AGCAGACGGGAGG	-14	TACGGTATGGAAGCTCTGGG	2,6

Tabelle 3.1 Sequenzen der CDR3-Regionen, verwendete VH-Gensegmente und VH-Mutationsfrequenzen von 27 Patienten und der Zelllinie RAMOS (5'-3'-Orientierung); IGH-Rearrangement = verwendete Segmente der VH, DH-, und JH-Familien; *angegeben sind nur die letzten 20 Basen des VH und die ersten 20 Basen des JH-Segments; N1, N2 = Insertionen beim Rearrangement; DEL = Deletionen beim Rearrangement im Bereich der Junktionsstellen; Bindungsstellen der spezifischen ASO-Rückwärts-Primer sind in grün und unterstrichen angegeben.

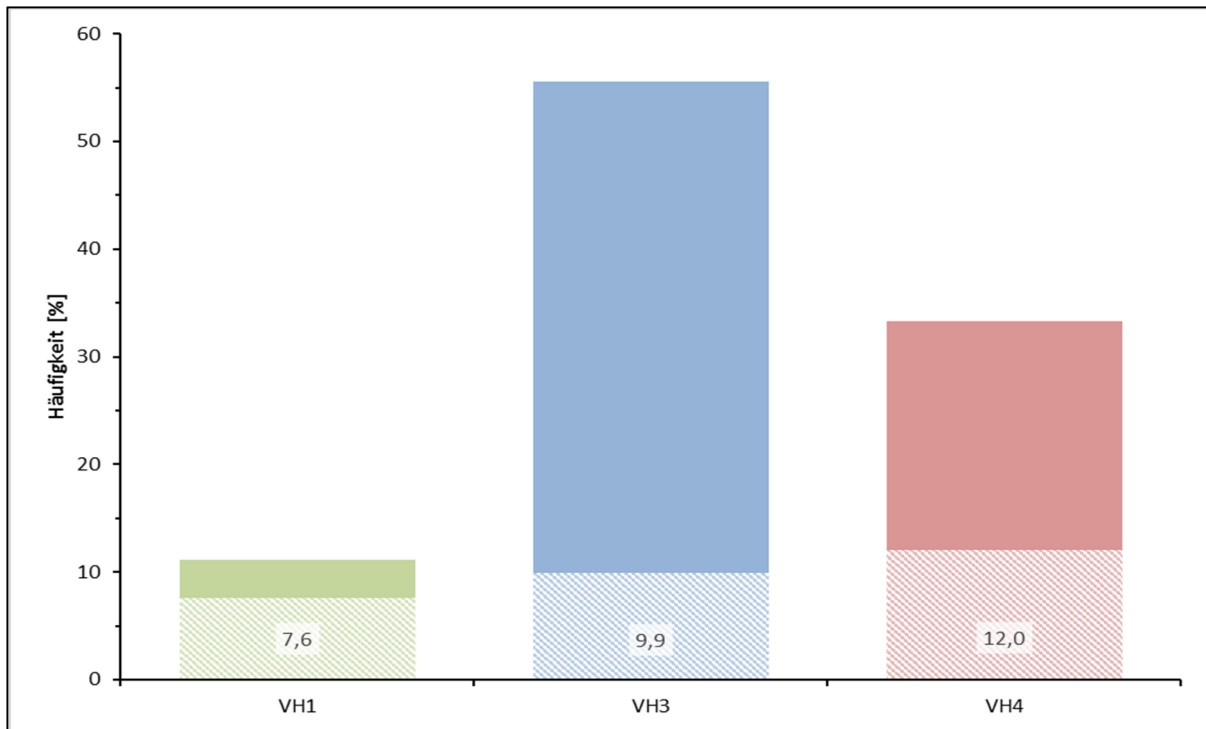


Abbildung 3.1 Häufigkeiten der verwendeten IGHV-Gensegmente der untersuchten klonalen IGH-Rearrangements von 27 Pat. mit FL (gesamte Säule) und der detektierten mittleren Mutationsfrequenzen bezogen auf die jeweiligen IGHV-Gensegmente (gestrichelter Anteil der Säule mit Prozent-Angabe)

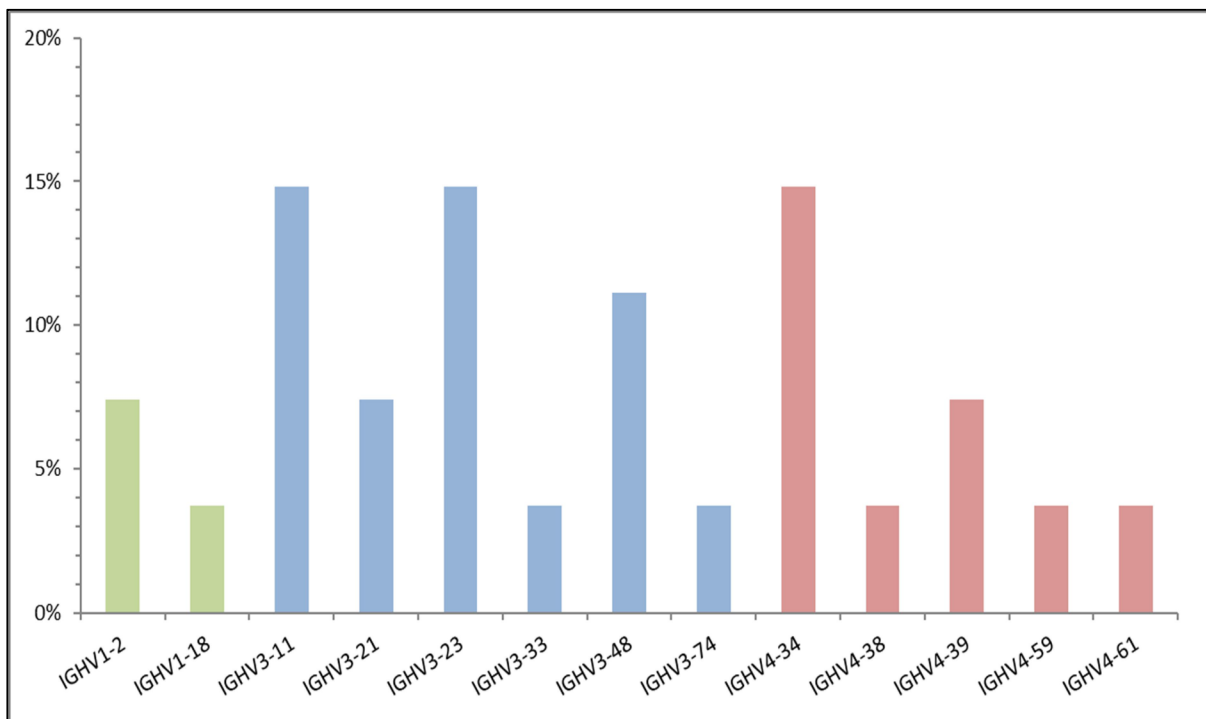


Abbildung 3.2 Darstellung der Häufigkeiten der verwendeten IGHV-Gensegmentfamilien der untersuchten klonalen IGH-Rearrangements von 27 Pat. mit FL

3.2 Etablierung und Validierung der Plasmid-Standards

Für die MRD-Quantifizierung anhand von Plasmid-Standards wurden von den 27 Patienten, für die in der FR1-IGH-PCR ein klonales Amplifikat nachgewiesen werden konnte, und der Zelllinie nach erfolgter Klonierung jeweils mindestens 5 Kolonien gepickt, präpariert und anschließend mit M13-Primern sequenziert. Es ließ sich dabei in 24/27 Fällen und bei der Zelllinie in mindestens einem, vielfach jedoch in mehreren oder allen sequenzierten Plasmiden das klonierte IGH-Rearrangement nachweisen. In den anderen 3 Fällen wurden IGH-Rearrangements detektiert, welche jedoch nicht mit dem initial aus dem Primärmaterial sequenzierten Klon identisch waren und somit am ehesten dem polyklonalen B-zellulären Hintergrund in der jeweiligen Probe zuzuordnen waren. Diese Proben wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zur Evaluation der patientenspezifischen IGH-Plasmide als Quantifizierungs-Standard standen somit 24 Patienten zur Verfügung.

Von diesen 25 Plasmiden (24 Patienten und Zelllinie RAMOS) wurde jeweils eine Standardkurve für die MRD-Quantifizierung mittels RQ-PCR erstellt. Für alle diese Fälle wurde entsprechend den im Kapitel 2.5.1 definierten Bedingungen jeweils ein Primer-Sonden-System designt bzw. ausgewählt, welches die Ansprüche an die Sensitivität und Spezifität des patientenspezifischen IGH-RQ-PCR-Ansatzes erfüllte. In der Tabelle 3.2 sind die Sequenzen der Primer und Sonden für die Patienten (UPN 1- 24) und die Zelllinie aufgeführt. In 11/24 Fällen wurde auf Konsensus-Sonden zurückgegriffen da hier keine somatischen Mutationen in den Bindungsstellen vorlagen. In den anderen Fällen wurden patientenspezifische (ASO-) Sonden designt. Hierbei zeigte sich keine Korrelation mit der Mutationsfrequenz der Gensegmentfamilien (VH1, VH3 oder VH4).

UPN	Vorwärts-Primer (FR2-ASO)	Reverser Primer (CDR3-ASO)	Konsensus-Sonde (FR3)	ASO-Sonde (FR3)
1	ATCTCTAGGGACAACGCCAAGA	CAAAAAGTCAAAGTACCCCTGATGT	TCCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
2	TCCAAGACCAOCTGTTTTTACA	GTCTGGAATTTCCGCTATAGTTCGTA		TAATATATGGCCGTGTCGTC
3	AGACTCTGTGAAGGGCCGATT	CAGAGGGTAATAACCAGTCTCGAAGA	TCCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
4	GTCACCATATCAGTAGACTGTCGAAGA	ACCAATTGTAOCCATCTCTCCCT	TGTCGGGGGGTTCACAGA (MVH4TER)	
5	GAAGGGCCGATTACCATCT	CGAGTTACCACCGTACCCCTCT	TCCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
6	AGAGTCGAGTACCATATCAGTAGACA	GTCTCTCTCGCAGAGTCG	TGTCGGGGGGTTCACAGA (MVH4TER)	
7	CAGAGACAACGTCAAGAACTATTG	CCCCTCTTTCCGACAGAAATA		AGTCTCGACTCTCAG
8	AGCACAGCCAACATGGAATTG	GTAGACCTGTCCACCTCTCGTA		CGTGTGTCAGATCT
9	CCGACGACACGTCCAGATATT	AAAAAATGGGAAAAGGCATCTC		CCCCCTTTCCGACAA
10	GAAAAATTCATTGTATCTCCAAATGC	CAGAGAGGAAGAATGAAGTGTGGA		TGTCGGCTCTCAGGC
11	GTGAAGGGTCGGTTCACCAT	CGAAGCCCATAGGTCAATT	CCGTCTCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
12	ACGCCAAGAACAGTTGTATGT	AAAGAATCATTAGCAOCCAAGGAT	CCGTCTCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
13	GAGCTCTGTGACCGCCG	CCAGTAGTCGAAAGCACATTAA		TCCTCGAATCGTACTCGTCCCGCACAGT
14	CATAATCCCAGAGACAATTCCA	AAAAGTTATCGCCACTGATCT		CGGGTCTCGTCTTTCAGGCTGTTC
15	CTCAAGAGTCGAGTACCATATCAG	GTGGTCCCAGTCACTACTGTTCT		CGTGTCCGGGGTTCACAGA
16	TCAAGAGTGTGTCACCATATCAA	ACCAGGTGTAGAAGGGCGAAC	CGTGTCTCGGGGGTTCACAGA (MVH4)	
17	CGAGAGACAATGCCAAGAATACA	CTGACCCAGTAGTCAAAAAAGAG		CGTGTCTCGGCTCGCAAGTCGTTTCATT
18	CCTCAAGAGTOGAGTCATTACATCA	AGTCAAAGTTCCACTTGAAATCT		CGTGTCTCGGGGGTGTATAATTTAG
19	GACGGTCGAAGAATCACTTC	GCCCCAAAAGTCGAAAAAATTA		GCCGTATCTCGGTCGGTCAGAGACGT
20	ACCATGACCAAGGACACGT	CATCATCGAOCCTCCCGTA	CTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGTGC (LVH1)	
21	GAATACGCTGTCTCTGCAAATGA	CCCAGACATTCAAAACCTCAAG	CCGTCTCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
22	TCCAGAGACAACGCCAAGAA	GACGTCCATAOCCGTTCTGTGTC	CCGTCTCTCGGCTCTCAGGC (LVH3)	
23	CAAACTTTGGCAGAAATTTCA	AGGCACCCTTAGAGGAATTTGTC		TGGCCGTGTGTCAGATGTCACTACTC
24	CTTTATATTTTGTACGAGACGACC	GGAGACGGTGACCTTTGTCC		TCAAAGGAACACTGGTGGATAGAACAGC
RAMOS	CAAGAAGCAGCTCTCCCTGAAG	TGOCAGGACTCGCCCTAGTA	TGTCGGGGGGTTCACAGA (MVH4TER)	

Tabelle 3.2 Sequenzen der Primer und Sonden für die IGH-RQ-PCR von 24 Patienten (UPN 1-24) und der Zelllinie; ASO = allelspezifisches Oligonukleotid; FR3-Konsensus-Sonden: Bezeichnung der Sonde in Klammern; alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben

Um die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der IGH-Quantifizierung anhand von Plasmid-Standards zu zeigen, erfolgte zunächst am Modell der Lymphom-Zelllinie RAMOS ein Vergleich der Amplifikationscharakteristika der Standardkurven aus IGH-Plasmiden und genomischer DNA. Beide Standardkurven wiesen hierbei Korrelationskoeffizienten von $\geq 0,992$ auf, die Steigungen (Slopes) lagen mit $-3,36$ für die genomische DNA (gDNA) und $-3,34$ für die Plasmide sehr nahe an der idealen Steigung von $-3,3$ für eine 10-fach Verdünnungsreihe. Die Effizienz der RQ-PCR war in beiden Fällen sehr gut, bei Werten $\geq 0,98$. Beide Verdünnungsreihen zeigten eine Sensitivität von 10^{-5} , im Falle der gDNA erstreckte sich der quantitative Messbereich um etwa 0,5 log-Stufen weiter als bei den Plasmiden,

$5 \cdot 10^{-5}$ gegenüber 10^{-4} . Der Vergleich der beiden Standardkurven, sowie die zugehörigen Kurvenwerte sind in Abbildung 3.3 und Tabelle 3.3 dargestellt.

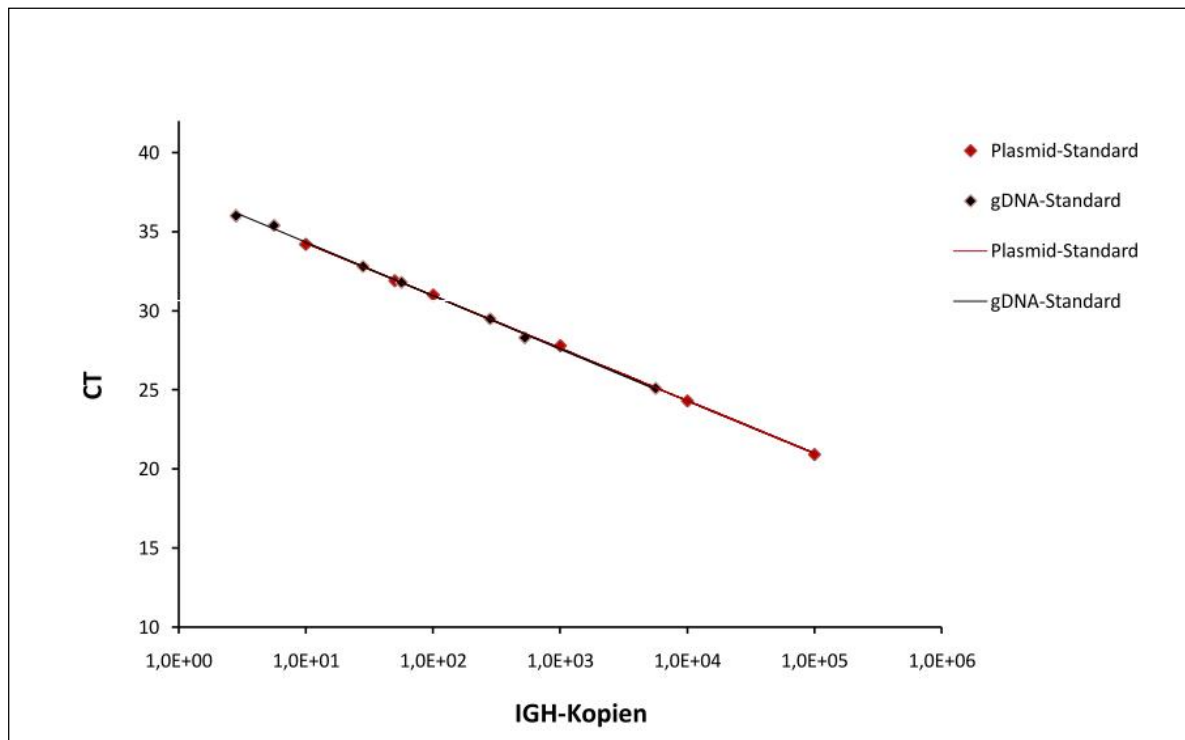


Abbildung 3.3 Standardkurven des IGH-Plasmid- und genomischen DNA-Standard der Zelllinie RAMOS; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs

UPN	Standard	Steigung	y-Achsenabschnitt	R ²	Effizienz*	QR**	Sensitivität	Buffy Coat
RAMOS	genomische DNA	-3,36	38,51	0,992	0,98	5,00E-05	1,00E-05	neg
RAMOS	Plasmid-DNA	-3,34	37,64	0,998	0,99	1,00E-04	1,00E-05	neg

Tabelle 3.3 Charakteristika der Standardkurven (IGH-Plasmid- und genomischer DNA-Standards) der Zelllinie RAMOS; R² = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{(-1/\text{Slope})-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation, **QR = quantitativer Messbereich (engl. quantitative range)

Im nächsten Schritt wurden serielle Verdünnungsstufen von genomischer DNA der Zelllinie anhand des IGH-Plasmid-Standards quantifiziert. Die Genauigkeit der Quantifizierung

mit dem Plasmid-Standard sollte durch Vergleich der gemessenen mit den Erwartungswerten untersucht werden. Es zeigte sich hierbei im mehrfachen Ansatz eine gute Reproduzierbarkeit der Messwerte, sowie erneut eine sehr gute PCR-Amplifikationseffizienz und eine hohe Korrelation der experimentell gemessenen mit den theoretisch zu erwartenden IGH-Kopien. Für den quantitativen Messbereich des IGH-Plasmid-Standards lagen die Abweichungen der gemessenen von den theoretisch zu erwartenden IGH-Kopien im Median bei 6,88 % (Minimum 1,38 %, Maximum 11,63. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Abbildung 3.4 dargestellt, die lineare Regression dieser Daten in der Abbildung 3.5. Als Ausdruck der extrem genauen IGH-Quantifizierung anhand des Plasmid-Standards zeigt die lineare Regression hierbei einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten mit $R^2 = 0,999$.

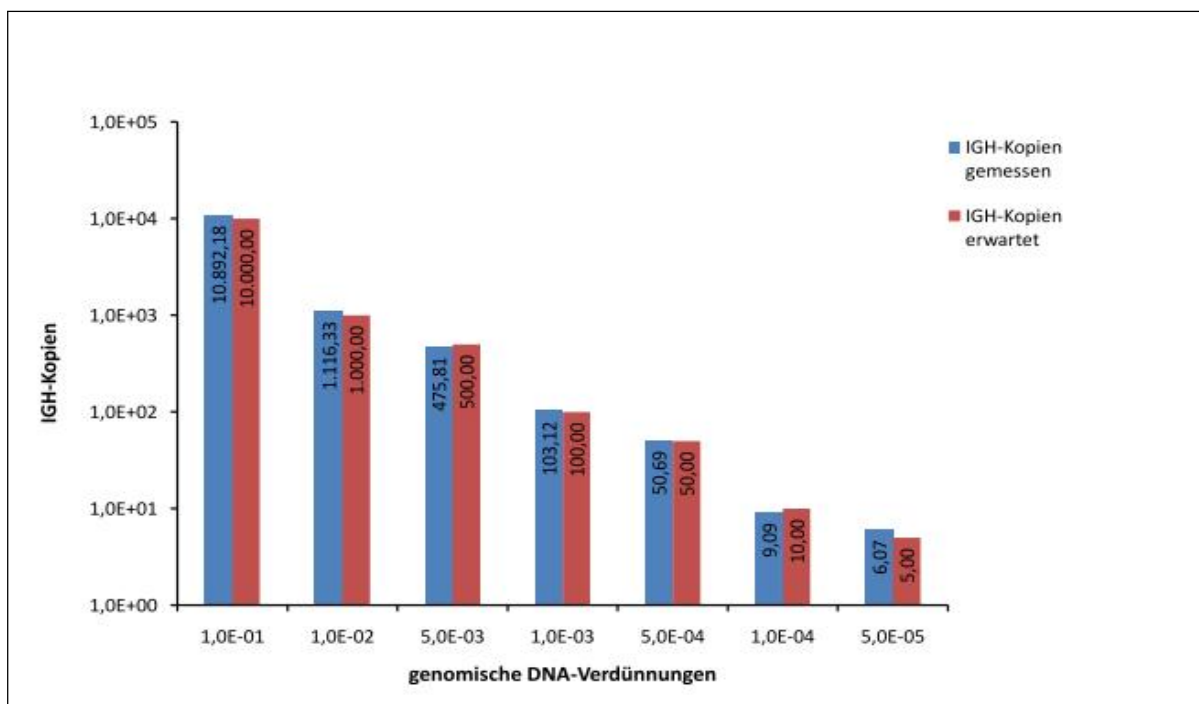


Abbildung 3.4 Quantifizierung der RAMOS gDNA-Verdünnungen am Plasmid-Standard; IGH-Kopien gemessen (Mittelwerte bei 3-fach Ansätzen) = am Plasmid-Standard quantifizierte IGH-Kopien der jew. gDNA-Verdünnungsstufe; IGH-Kopien erwartet = rechnerisch anhand der eingesetzten DNA-Menge zu erwartende IGH-Kopien in den jew. gDNA-Verdünnungsstufen

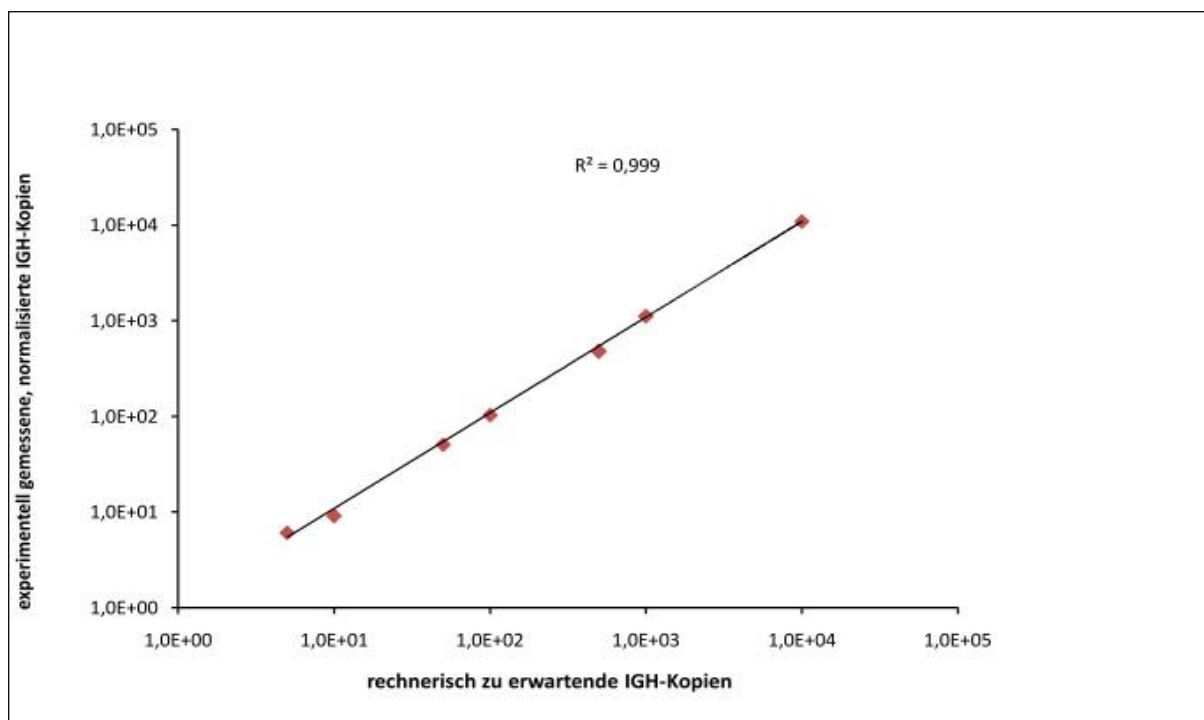


Abbildung 3.5 Lineare Regression der Daten aus Abb. 3.8; R^2 = Pearson-Korrelationskoeffizient; x-Achse = logarithmische Darstellung der rechnerisch zu erwartenden IGH-Kopien; y-Achse = logarithmische Darstellung der mittels IGH-RQ-PCR quantifizierten IGH-Kopien

In einem nächsten Schritt wurden die 24 Plasmid-Standards der Patientenproben im Hinblick auf ihre Sensitivität und Spezifität nach den zur Qualitätsprüfung geltenden EuroMRD-Kriterien ausgewertet (van der Velden et al. 2007). Es konnte eine mediane Sensitivität von 10^{-5} und ein medianer quantitativer Messbereich von $5 \cdot 10^{-5}$ erreicht werden. Der Korrelationskoeffizient lag im Median bei 0,998. Eine unspezifische Amplifikation von Buffy-Coat durch die ausgewählten Primer-Proben-Systeme zeigte sich nur in 3 Fällen, allerdings ohne Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität dieser Assays.

Somit erfüllten alle IGH-Plasmid-basierten Quantifizierungs-Assays die angelegten Qualitätskriterien und bewiesen aufgrund des sehr hohen Maßes an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit eine sehr gute Eignung zur nachfolgenden Quantifizierung der Verlaufsproben. Die 24 IGH-Plasmid-Standardkurven sind in Abbildung 3.6 und Tabelle 3.4 dargestellt.

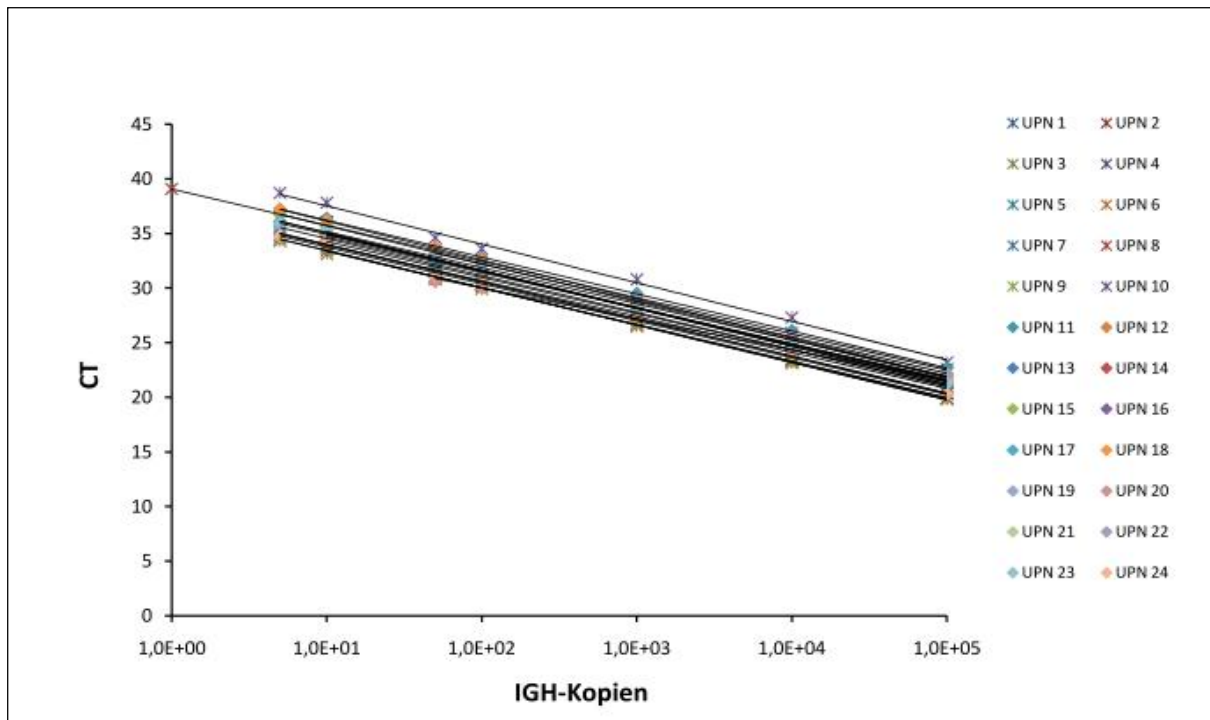


Abbildung 3.6 Standardkurven der IGH-Plasmid-Standards der Patienten UPN 1-24; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs

UPN	Steigung	y-Achsen- abschnitt	R ²	Effizienz*	QR**	Sensitivität	Buffy coat
1	-3,41	37,42	0,996	0,96	5,00E-05	1,00E-05	neg
2	-3,31	39,07	0,995	1,01	1,00E-05	1,00E-05	neg
3	-3,35	36,72	0,998	0,99	1,00E-04	1,00E-05	neg
4	-3,39	37,16	0,998	0,97	5,00E-05	1,00E-05	39,3
5	-3,28	37,25	0,998	1,02	5,00E-05	1,00E-05	39,6
6	-3,41	36,82	0,996	0,96	5,00E-05	1,00E-05	neg
7	-3,37	37,88	0,999	0,98	5,00E-05	1,00E-05	neg
8	-3,38	36,77	0,998	0,98	1,00E-04	1,00E-05	neg
9	-3,41	36,85	0,998	0,96	5,00E-05	1,00E-05	neg
10	-3,52	41,04	0,995	0,92	5,00E-05	5,00E-05	neg
11	-3,34	39,47	0,998	0,99	5,00E-05	1,00E-05	neg
12	-3,24	37,95	0,996	1,04	1,00E-04	1,00E-05	neg
13	-3,35	37,73	0,995	0,99	1,00E-04	1,00E-05	neg
14	-3,39	38,80	0,998	0,97	1,00E-04	1,00E-05	neg
15	-3,52	39,21	0,996	0,92	5,00E-05	1,00E-05	neg
16	-3,39	38,17	0,998	0,97	1,00E-04	1,00E-05	neg
17	-3,43	38,39	0,998	0,96	5,00E-05	1,00E-05	neg
18	-3,58	39,77	0,995	0,90	5,00E-05	1,00E-05	neg
19	-3,41	38,45	0,997	0,96	5,00E-05	1,00E-05	neg
20	-3,41	38,19	0,998	0,96	5,00E-04	1,00E-04	neg
21	-3,37	38,46	0,996	0,98	1,00E-04	1,00E-05	neg
22	-3,48	39,47	0,999	0,94	5,00E-04	5,00E-05	37,0
23	-3,52	38,63	0,995	0,92	5,00E-05	1,00E-05	neg
24	-3,38	37,33	0,996	0,98	5,00E-05	1,00E-05	neg
Minimum	-3,58	36,72	0,995	0,90	1,00E-05	1,00E-05	-
Maximum	-3,24	41,04	0,999	1,04	5,00E-04	1,00E-04	-
Mittelwert	-3,40	38,21	0,997	0,97	1,00E-04	1,71E-05	-
Median	-3,39	38,18	0,998	0,97	5,00E-05	1,00E-05	-
Standard- abweichung	0,08	1,08	0,001	0,03	1,23E-04	2,05E-05	-

Tabelle 3.4 Charakteristika der IGH-Plasmid-Standards der Patienten UPN 1 - 24; R² = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{-(1/Slope)-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation (wenn negativ = neg., wenn positiv = CT-Wert), **QR = quantitativer Messbereich (engl. quantitative range), gestrichelte Linie trennt die Studien „GLSG 2000“ und „GADOLIN“

Als nächster Schritt erfolgte ein Vergleich von IGH-Plasmid-Standardkurven mit Standardkurven aus genomischer DNA für 8 dieser Patienten. Die hier zugehörigen Daten sind in der Abbildung 3.7 und der Tabelle 3.5 dargestellt.

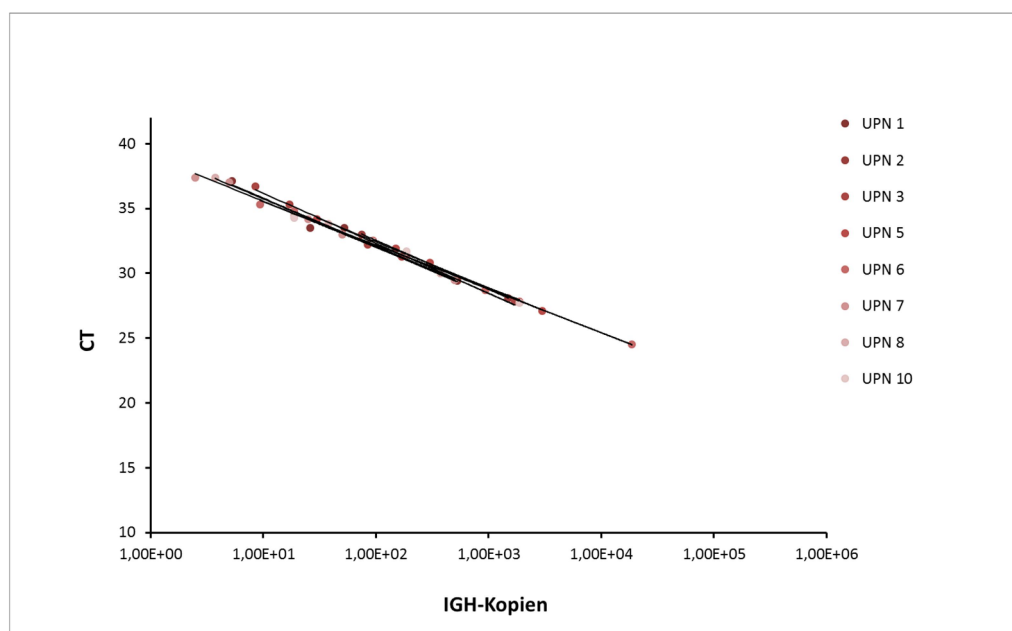


Abbildung 3.7 Standardkurven der IGH-genomischen DNA-Standards der Patienten UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs

UPN	Steigung	y-Achsen-Abschnitt	R ²	Effizienz*	QR**	Sensitivität	Buffy coat
1	-3,74	39,52	0,964	0,85	5,25E-05	2,62E-05	neg
2	-3,96	40,50	0,991	0,79	7,50E-04	1,50E-05	neg
3	-3,86	40,06	0,989	0,82	8,50E-05	1,00E-05	neg
4							
5	-3,54	39,50	0,994	0,92	3,00E-04	3,00E-05	38,2
6	-3,36	38,90	0,996	0,98	9,40E-05	9,40E-05	neg
7	-3,53	39,00	0,997	0,92	2,50E-04	1,00E-05	neg
8	-3,63	39,36	0,972	0,89	3,75E-05	1,00E-05	neg
9							
10	-3,70	39,86	0,984	0,86	1,88E-04	1,00E-05	neg
Minimum	-3,96	38,90	0,964	0,79	3,75E-05	1,00E-05	-
Maximum	-3,36	40,50	0,997	0,98	7,50E-04	9,40E-05	-
Mittelwert	-3,67	39,59	0,986	0,88	2,20E-04	2,57E-05	-
Median	-3,67	39,51	0,990	0,87	1,41E-04	1,25E-05	-
Standardabweichung	0,18	0,50	0,011	0,06	2,19E-04	2,69E-05	-

Tabelle 3.5 Charakteristika der genomischen (IGH-) DNA-Standards der Patienten UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10; R² = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{(-1/\text{Slope})-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation **QR = quantitativer Messbereich (engl. quantitative range); graue Buchstaben: Assay erfüllt nicht EuroMRD-Kriterien; fett gedruckt: Werte, die die EuroMRD-Kriterien nicht erfüllen (van der Velden et al. 2007)

Die Standardkurven beider Methoden zeigten eine vergleichbar gute Sensitivität (Median = 10^{-5} vs. $1,25 \cdot 10^{-5}$), wobei die Plasmid-Standards einen besseren quantitativen Messbereich als die gDNA-Standards aufwiesen (Median = $5 \cdot 10^{-5}$ vs. $1,41 \cdot 10^{-4}$). Es zeigte sich eine signifikante Überlegenheit der Plasmid-Standards gegenüber den gDNA-Standards hinsichtlich der Korrelationskoeffizienten (Median = 0,998 vs. 0,990; p-Wert 0,009), der Steigungen der Standardkurven (Median = -3,39 vs. -3,67; p-Wert 0,008) sowie der PCR-Effizienz (Median = 0,97 vs. 0,87; p-Wert = 0,008). Diese Daten sind in der Abbildung 3.8, in Form von Box-Whisker-Plots dargestellt. Zusammenfassend zeigte sich hierbei also, dass die Plasmid-Standards bei gleich guter Sensitivität und Spezifität eine signifikant bessere Amplifikationseffizienz und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu genomischen DNA-Standards aufwiesen und somit eine sehr gute Alternative für eine MRD-Quantifizierung von Verlaufsproben darstellen.

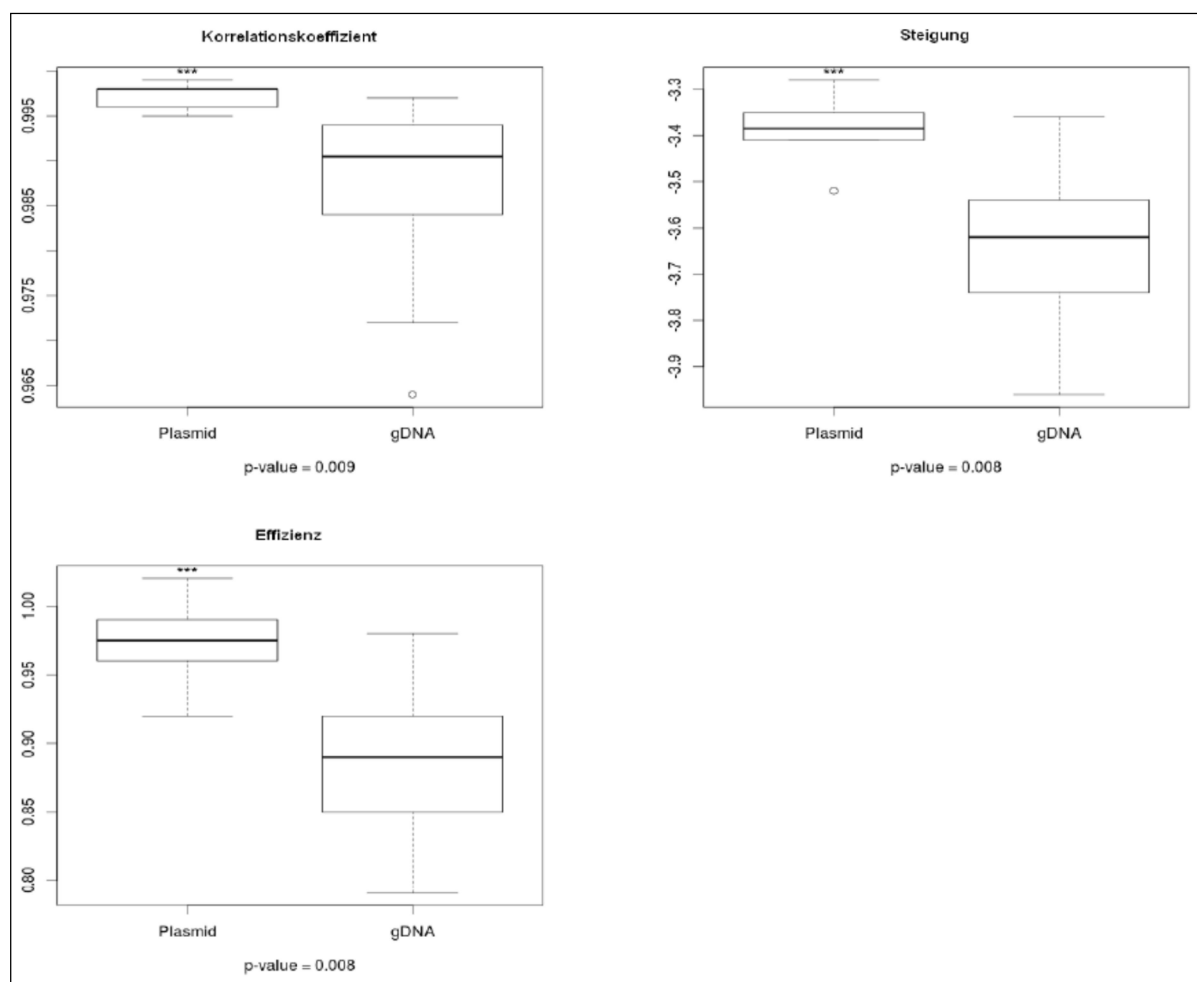
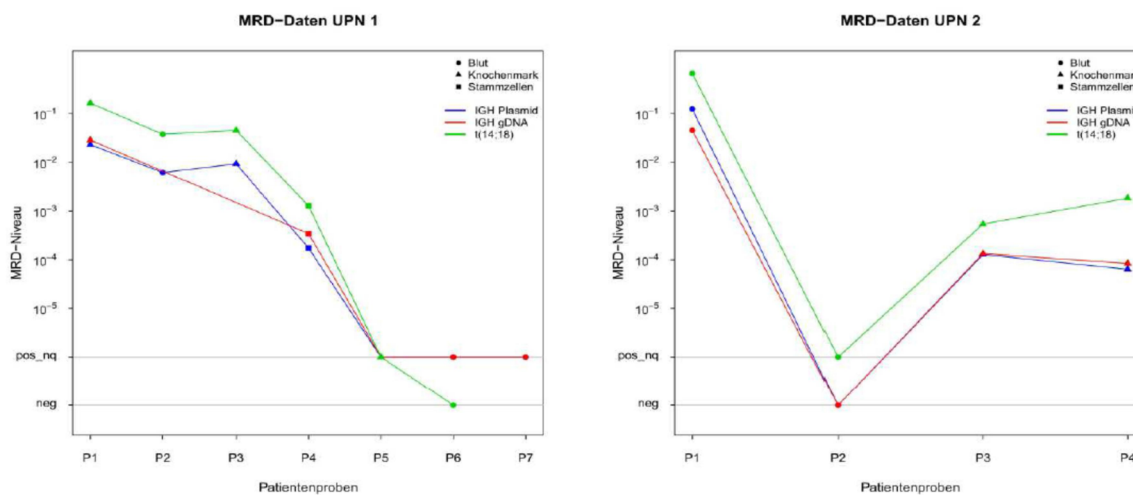


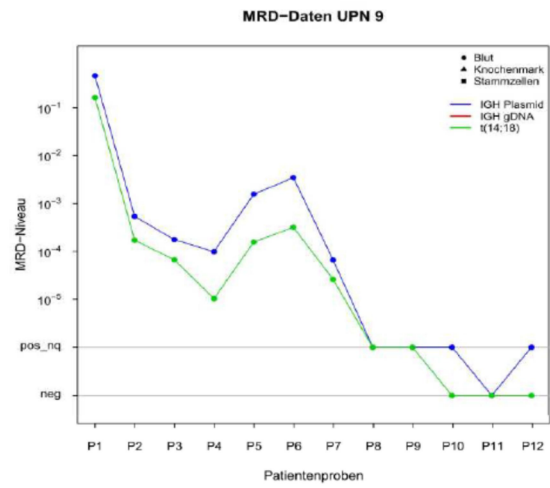
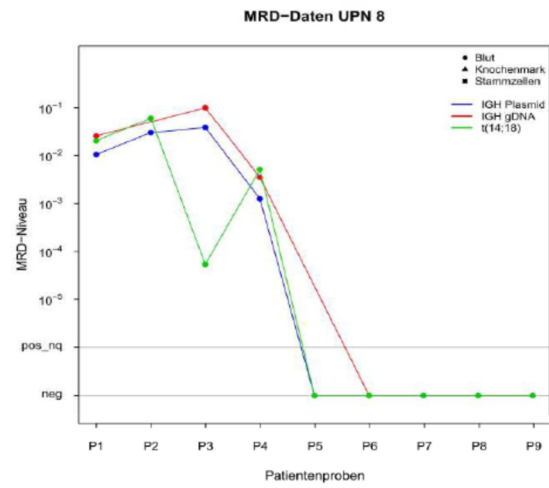
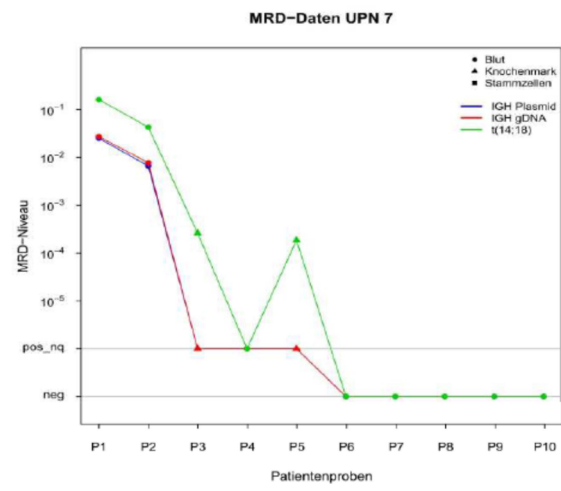
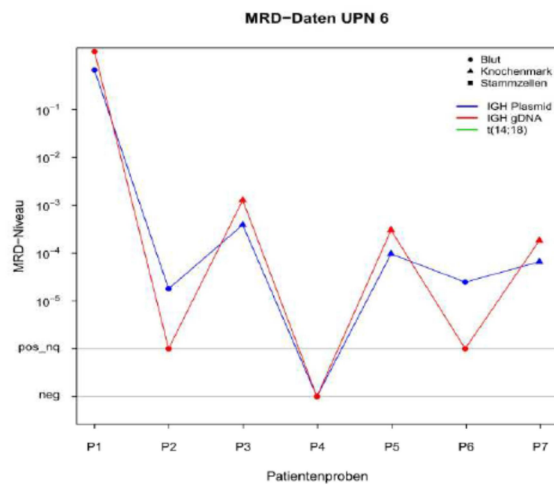
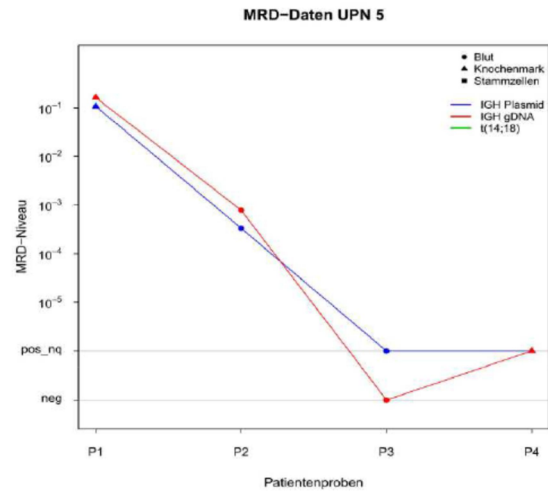
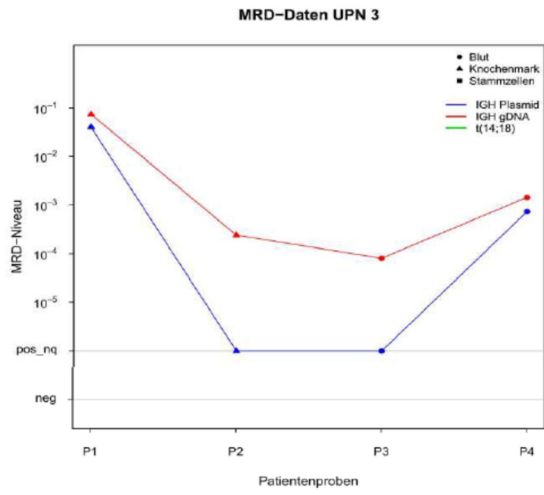
Abbildung 3.8 Vergleich der Charakteristika der IGH-Plasmid und genomischen DNA-Standards (UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10); oben-links: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Standardkurven; oben-rechts: Steigungen

der Standardkurven; unten-links: Effizienzen der RQ-PCR-Assays; Box-Whisker-Plots: Oberes bzw. unteres Ende der Box = oberes bzw. unteres Quartil, Querstrich in der Box = Median, Ende der Whisker = 1,5-facher Interquartilsabstand, *** = signifikant überlegener Standard, ○ = Ausreißer; p-Werte nach Wilcoxon-Test angeben

3.3 MRD-Verlaufsanalysen anhand der Plasmid-Standards

Bei 24 Patienten (insgesamt 109 DNA-Proben) wurden die IGH-Plasmid-Standards zur MRD-Erfassung im Therapieverlauf angewendet. Neben der Frage nach der praktischen Anwendbarkeit sollte hierbei auch ein Vergleich von MRD-Niveaus erfolgen, welche mit unterschiedlichen Methoden gemessen wurden. Für 8 Patienten wurde die IGH-Plasmid-basierte MRD-Quantifizierung mit der IGH-RQ-PCR-Quantifizierung mit gDNA-Standards verglichen, für 6 Patienten lagen zum Vergleich Daten einer MRD Quantifizierung mittels t(14;18)-RQ-PCR vor. Bei 5 der zuvor genannten Patienten konnten alle drei Quantifizierungsstrategien verglichen werden. In der Abbildung 3.9 sind die MRD-Niveaus der Primär- und Verlaufsmaterialien der jeweiligen Patienten dargestellt.





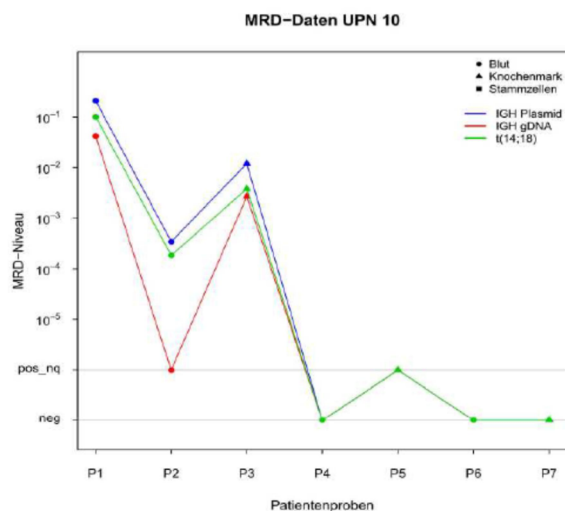


Abbildung 3.9 MRD-Niveaus der Patientenproben (UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10) quantifiziert mit IGH-Plasmid-Standard und genomischem DNA (gDNA)-Standard oder/ und t(14;18)-Standard; P1, 2, 3, ..., Pn = Patientenproben zum Zeitpunkt 1, 2, 3, ..., n; pos_nq = positiv aber außerhalb des quantifizierbaren Messbereiches, neg = negativ

Zur deskriptiven Analyse und Bewertung dieser Untersuchungen wurde der Grad der Konkordanz eines mit zwei bzw. drei Methoden gemessenen MRD-Niveaus einer Verlaufsprobe in drei willkürliche Kategorien eingeordnet (A, B und C), welche die Konkordanz sinngemäß wiedergeben sollen. Die Kategorien A, B und C beziehen sich auf die Abweichung der jeweils für eine Probe mit zwei oder drei vergleichenden Methoden gemessenen MRD-Niveaus (Δ MRD-Niveau) und sind folgendermaßen definiert:

- Kategorie A („hohe“ Konkordanz): Δ MRD-Niveau von $< 0,5$ log-Stufen
- Kategorie B („mittlere“ Konkordanz): Δ MRD-Niveau von $0,5$ bis 1 log-Stufe
- Kategorie C („keine“ Konkordanz): Δ MRD-Niveau von ≥ 1 log-Stufe

Aufgeschlüsselt auf die drei Methoden-Vergleiche stellen sich die Ergebnisse im Einzelnen folgendermaßen dar:

(1) IGH-Plasmid-Standard und genomischer IGH-DNA-Standard (UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10; n = 47 Proben): Hier zeigte sich in $87,2\%$ ($41/47$) der Fälle eine „hohe“ und in $10,6\%$ ($5/47$) eine „mittlere“ Konkordanz. Nur in einem Fall ($1/47 = 2,1\%$) wurde „keine“ Konkordanz gesehen.

(2) IGH-Plasmid-Standard und t(14;18)-Zelllinien-Standard (UPN 1, 2, 7, 8, 9, 10; n = 48 Proben): Hierbei zeigte sich eine „hohe“ Konkordanz in 64,6 % (31/48) und eine „mittlere“ Konkordanz in 20,8 % (10/48) der Fälle. Bei 14,6 % (7/48) wurde „keine“ Konkordanz gesehen.

(3) IGH-Plasmid-Standard, genomischer IGH-DNA-Standard und t(14;18)-Zelllinien-Standard (UPN 1, 2, 7, 8, 10; n = 31 Proben): Hier lag in 64,5 % (20/31) der Fälle eine „hohe“ und in 19,4 % (6/31) der Fälle eine „mittlere“ Konkordanz vor. In 16 % (5/31) der Fälle lag „keine“ Konkordanz vor.

Diese Ergebnisse zeigen ein überwiegend hohes Maß an Übereinstimmung der MRD-Niveaus, welche mit unterschiedlichen Methoden gemessen wurden und unterstreichen somit die Möglichkeit einer zuverlässigen und genauen Quantifizierung von Patienten-Verlaufsmaterialien mit dem IGH-Plasmid-Standard.

Aufgrund der zuvor erzielten hohen Reproduzierbarkeit und Sensitivität wurde im weiteren Verlauf der Untersuchung eine IGH-Plasmid-basierte MRD-Quantifizierung im Rahmen einer prospektiven Studie bei rezidierten FL untersucht. Hier standen 41 Primär- und Verlaufsmaterialien von 14 Patienten (UPN 11-24) zur Verfügung. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 3.10 dargestellt. Für alle 14 Patienten dieser Studie konnte prospektiv ein IGH-Plasmid-Standard zur Quantifizierung etabliert werden. Alle untersuchten Primär- und Verlaufsmaterialien ließen sich daran zuverlässig quantifizieren. Die MRD-Quantifizierung zeigt die Kinetik des MRD-Abfalles unter einer Antikörper-basierenden Rezidivtherapie.

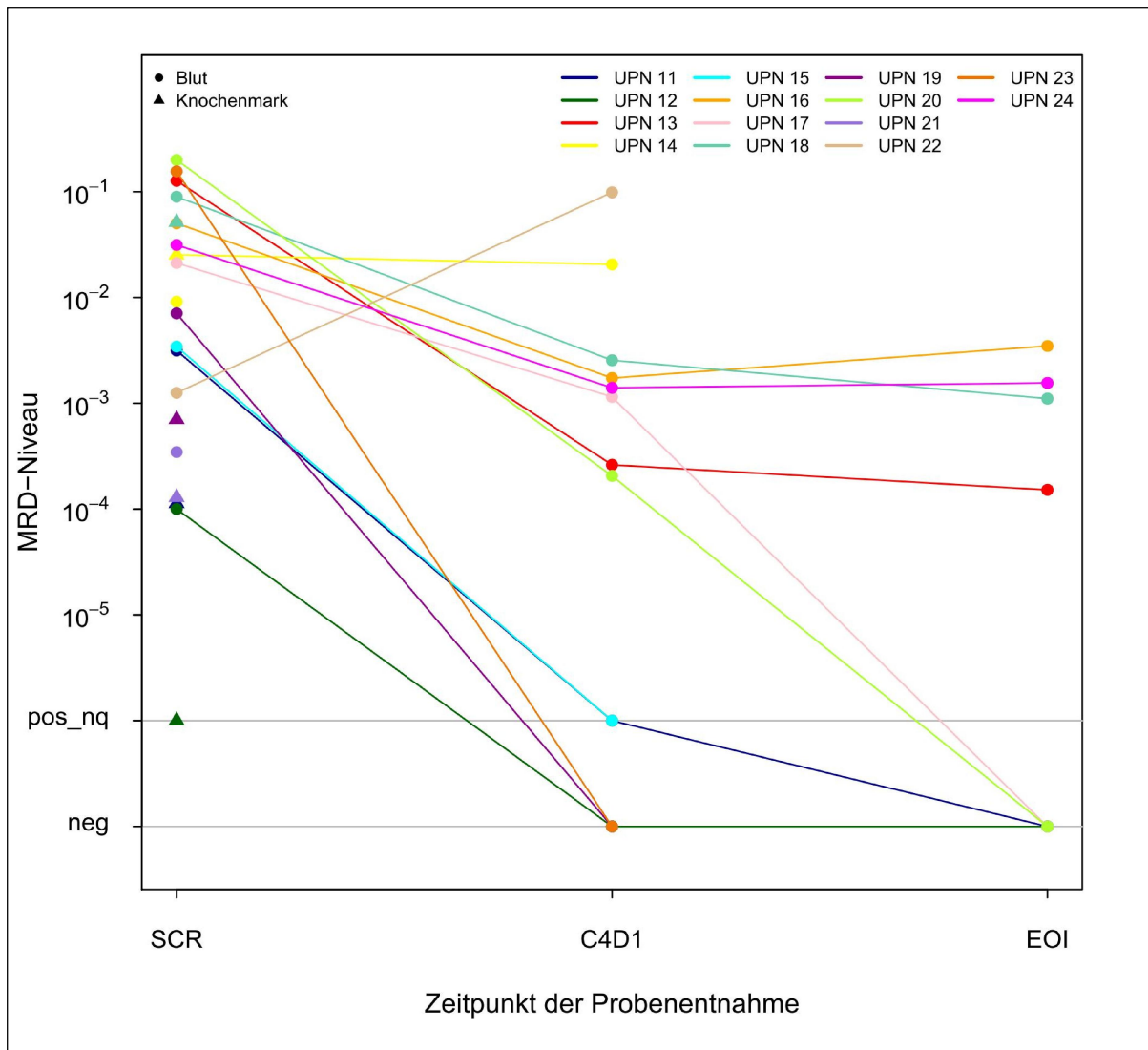


Abbildung 3.10 MRD-Verläufe von 14 Patienten (UPN 11-24), SCR = Screening, C4D1 = 1. Tag des 4. Chemotherapie-Zyklus, EOI = End of Induction, pos_nq = positiv aber außerhalb des quantifizierbaren Messbereiches, neg = negativ

4 Diskussion

In den vergangenen Jahren konnte die prognostische Relevanz der quantitativen MRD-Diagnostik bei den reifzelligen B-Zell-Lymphomen, insbesondere auch beim folliculären Lymphom gezeigt werden (Galimberti et al. 2014; Ladetto et al. 2013; Ladetto et al. 2008; Ladetto et al. 2006). Im Zuge der Weiterentwicklung therapeutischer Optionen beim FL, beispielsweise neuer Generationen monoklonaler Antikörper, Antikörper-Toxin-Konjugaten, immunmodulierenden Substanzen oder Molekülen, welche Signaltransduktions-Kaskaden beeinflussen, denen in der Mono- oder in Kombinationstherapie zumindest das Potential einer verbesserten antineoplastischen Effektivität unterstellt werden kann, erscheint es geradezu unumgänglich auch die Methoden der Diagnostik weiterzuentwickeln. Hierbei hat die quantitative MRD-Diagnostik mit ihrer hohen Sensitivität natürlich einen ganz besonderen Stellenwert. Betrachtet man die Möglichkeit anhand von MRD eine Erhaltungstherapie bzw. sogar eine präemptive Therapie zu steuern, oder aber zu Beginn einer Behandlung anhand einer MRD-Risikostratifizierung eine möglichst individualisierte und somit rationale und besser verträgliche Therapie zu wählen, so begründet sich darin der Wunsch möglichst viele Patienten mit hämatolymphatischen Neoplasien mittels einer MRD-Quantifizierung erfassen zu können.

Wie im Rahmen der Einleitung beschrieben stellt die t(14;18)-Translokation für die quantitative MRD-Diagnostik mittels RQ-PCR beim FL den derzeitigen Goldstandard dar. Diese Aberration ist bei etwa 90 % der Patienten mit FL überhaupt nachweisbar (Leich et al. 2011; Aster und Longtine 2002), jedoch nur in etwa 50 - 60 % dieser Fälle mittels Multiplex-PCR amplifizierbar (Evans et al. 2007; van Dongen et al. 2003). Eine alternative Strategie bestünde in der Verwendung des klonalen IGH-Rearrangement als molekulare Zielstruktur. Mittels einer Konsensus-IGH-PCR kann in bis zu 88 % der (post-) Keimzentrums- und 92 % aller B-Zell-Neoplasien ein klonales Target identifiziert werden und stünde somit prinzipiell bei einem sehr großen Teil der Patienten mit FL zur Verfügung (van Dongen et al. 2003). Diese Strategie beinhaltet gerade im Falle des FL jedoch gewisse Limitationen. Für

den bislang bei anderen B-Zell-Neoplasien üblichen Ansatz der IGH-Quantifizierung mittels RQ-PCR wird zur Erstellung der Standardkurve die Kenntnis des Tumor- bzw. Lymphomzellgehaltes in der primärdiagnostischen Probe benötigt, welcher beispielsweise bei den akuten B-lymphatischen Leukämien oder der CLL relativ einfach mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden kann. Zudem wird bei dieser Strategie zu jedem Zeitpunkt einer Verlaufspalten-Untersuchung erneut primärdiagnostisches Material für die Standard-Verdünnungsreihe benötigt. Beides ist aus verschiedenen Gründen beim FL nicht immer möglich, woraus sich die Rationale für eine alternative Strategie ergibt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die Verwendung klonspezifischer IGH-Plasmide als Standard für quantitative MRD-Erfassung das Potenzial besitzt diese Alternative bei Patienten mit FL darzustellen.

Es konnte am Beispiel einer B-Zell-Lymphom-Zelllinie im Rahmen eines Vergleiches gezeigt werden, dass die klonspezifischen Plasmid-Standards gegenüber genomischer DNA, in Bezug auf die relevanten Amplifikationscharakteristika vergleichbar gute Ergebnisse zeigten. Es war eine sehr genaue Quantifizierung von genomischen DNA-Proben der Zelllinie in einem breiten Bereich von 1 Kopie bis 10.000 Kopien anhand des Plasmid-Standards, bei guter Reproduzierbarkeit, möglich. Diese Ergebnisse zeigten, dass die vorgeschlagene Methode zur MRD-Quantifizierung valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Folglich konnte auch an insgesamt 109 DNA-Proben von 24 Patienten mit FL sowohl der Nachweis einer genauen IGH-Quantifizierung anhand von Plasmid-Standards mit guter Reproduzierbarkeit als auch der praktischen Anwendbarkeit dieser Methode erbracht werden. Insbesondere im Vergleich mit genomischen DNA-Standards konnte, bei vergleichbar hoher Sensitivität und Spezifität, eine signifikante Überlegenheit der Plasmid-Standards bezüglich Korrelationskoeffizient, Steigung der Standardkurve und Amplifikationseffizienz gezeigt werden. Es lag insgesamt eine hohe Korrelation von gemessenen MRD-Niveaus der Verlaufspalten vor, wenn diese vergleichend anhand der Plasmid-Standards, genomischen IGH-DNA-Standards und dem MRD-Goldstandard beim FL, der t(14;18)-Translokation-RQ-PCR verglichen wurden. Als abschließenden Beleg auch für die praktische Anwend-

barkeit konnte im Rahmen einer prospektiven Studie für insgesamt 41 Primär- und Verlaufsproben von 14 Patienten ein plasmidbasierter IGH-RQ-PCR-Assay etabliert und die MRD der Verlaufsproben somit zuverlässig quantifiziert werden. Zusammenfassend stellt die vorgeschlagene IGH-Plasmid-Methode also ein valides, reproduzierbares und praktisch anwendbares Verfahren dar und eignet sich somit hervorragend als Alternative zur MRD-Quantifizierung bei B-Zell-Lymphomen.

Es gibt bislang nur sehr limitierte Daten bzw. publizierte Untersuchungen, welche die Verwendung einer plasmidbasierten MRD-Quantifizierungsstrategie für das klonale IGH-Rearrangement systematisch und in relevanter Größenordnung evaluiert haben (Ladetto et al. 2000). Kürzlich wurde diese Fragestellung durch eine französische Arbeitsgruppe für Proben von Mantelzelllymphom-Patienten adressiert (Gimenez et al. 2012). Diese Arbeit stellt die bislang standardisierteste und aussagekräftigste Untersuchung in diesem Kontext dar. Es wurden bei der Analyse, ebenfalls unter Bezugnahme auf die im Rahmen dieser Arbeit zugrunde gelegten EuroMRD-Kriterien, vergleichbare Werte für die IGH-Plasmid-Standardkurven bzw. Quantifizierungs-Assays gesehen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnten. Auch Gimenez et al. kommen zu dem Schluss, dass dieser Ansatz neben dem erbrachten Nachweis der Validität und Reliabilität eben auch eine gute klinische Anwendbarkeit aufweist.

Im generellen methodischen Vergleich zur Verwendung genomischer, primärdiagnostischer DNA als Ausgangsmaterial zur Erstellung des IGH-RQ-PCR-Assay, ist die Etablierung eines klonspezifischen Plasmid-basierten Assay insgesamt durchaus aufwendiger. Die hierbei zusätzlich anfallenden Arbeitsschritte wie Klonierung, einschließlich Bakterienkulturen, Plasmidpräparation, Restriktionsverdau und Plasmidaufreinigung sind zum einen zeitaufwändig, zum anderen beinhalten sie potentielle Fehlerquellen, beispielsweise durch häufiges Pipettieren sehr geringer Volumina und DNA-Mengen sowie zahlreicher einzelner Arbeitsschritte. Die niedermolekularen Plasmide können im Bereich niedriger Konzentrationen, also in den Verdünnungsstufen des Standards mit niedrigen Kopienzahlen, ein Problem darstellen, da es zur Adhärenz der Plasmidmoleküle an die Wand der Reaktionsgefäße kommen kann und dies die Messungen stark beeinflussen bzw. verfälschen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde diesem Problem mit dem Auswaschen der Tubes mit bovinem Serumalbumin vor dem Pipettieren der Plasmidlösungen entgegengewirkt. Betrachtet man die Genauigkeit der Messungen auch im Bereich geringer Kopienzahlen, so kann das genannte Problem auf diese Weise weitestgehend eliminiert werden.

Ein weiteres Problem im Labor kann der Umgang mit Plasmiden darstellen, welche eine klonale und somit eine für bestimmte hämatolymphatische Neoplasie definierende Gensequenz enthalten. Der Nachweis dieser Klonalität im Blut oder Knochenmark kann als ein Kriterium genutzt werden um die Diagnose einer malignen lymphatischen Neoplasie zu stellen bzw. zu stützen. Die hochamplifizierten Plasmide stellen somit im Falle einer Kreuzkontamination im Labor eine mögliche Ursache für falsch-positive Ergebnisse dar, was weitreichende Folgen haben könnte. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Experimente zu dieser Arbeit eine strenge räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Arbeiten vorgenommen, sodass die Patienten-DNA-Proben nicht in Kontakt mit klonalen Plasmiden kommen konnten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur kritischen Einordnung der vorliegenden Arbeit stellt die Auswahl der PCR-Strategie, genauer die Auswahl der PCR-Primer und -Sonden dar. Wie zuvor dargestellt wurden relativ hohe Mutationsfrequenzen im Bereich der rearrangierten IGH-Gensegmente bei den hier untersuchten DNA-Proben von Patienten mit FL gefunden, welche den in der Literatur angegebenen Daten entsprechen (Aarts et al. 2000; Berget et al. 2015). Aus diesem Grunde wurde eine IGH-RQ-PCR-Strategie gewählt, welche auf der Verwendung zweier allelspezifischer Oligonukleotide (ASO), als Vorwärts-, respektive Rückwärts-Primer, in Kombination mit einer auf dem Antisense-Strang liegenden Konsensussonde basierte. Durch die Verwendung zweier ASO-Primer, welche also für jeden Patienten bzw. dessen diagnostisches DNA-Material designt werden mussten, sowie die Platzierung der Sonde auf dem Sense-DNA-Strang, bezogen auf den hochspezifischen reversen CDR3-ASO-Primer, wird die größtmögliche Spezifität des Assays erreicht. Das patienten-/klonspezifische Primerdesign ist jedoch zeitaufwendig, arbeits- und in gewissem Maße kostenintensiver und erfordert Erfahrung und Expertise bezüglich der molekularen Grundlagen und Interpretation der Immunglobulin-Rearrangements. Aus diesen Gesichtspunkten

wurde, sofern die jeweilige Mutationsfrequenz es zuließ, auf sogenannte familien-spezifische, publizierte Konsensussonden zurückgegriffen (Ladetto et al. 2000).

Bezüglich des hier durchgeführten Vergleiches der Plasmid-Standard-Methode mit den etablierten Methoden der MRD-Quantifizierung mittels RQ-PCR beim FL bzw. anderen B-Zell-Neoplasien, der t(14;18)-PCR und der IGH-PCR anhand primärdiagnostischer gDNA, sind bestimmte Aspekte kritisch zu diskutieren. Es wäre prinzipiell wünschenswert diesen Methodenvergleich anhand von längeren Erkrankungsverläufen mit einer größeren Anzahl an konsekutiven Verlaufsproben durchzuführen. Idealerweise auch in solchen Fällen, die zunächst einen Abfall des MRD-Niveaus bis zur Negativität und im weiteren Verlauf dann wieder einen signifikanten Anstieg der MRD, korrelierend zu einem klinisch manifesten Rezidiv, aufzeigen. Dies sollte in der Folge im Rahmen von prospektiven Erhebungen in größerem Rahmen durchgeführt werden. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode fand bereits Eingang in die Routinediagnostik unseres Labors, indem im Rahmen von großen prospektiven Therapiestudien diejenigen Patienten mit FL, welche keine amplifizierbare t(14;18) aufweisen, systematisch mit dem IGH-Plasmid-Assay quantifiziert werden.

Der Grad der Korrelation von zwei mit unterschiedlichen Methoden gemessenen MRD-Werten wurde in dieser Arbeit willkürlich in drei Kategorien subklassifiziert. Diese geben sicher sinngemäß eine Vergleichbarkeit wieder, jedoch ist dies durchaus kritisch zu beleuchten. Ob ein Unterschied zweier MRD-Niveaus von weniger als einer halben log-Stufe als hohe Konkordanz beschrieben kann ist ohne weitere prospektive Erhebung des Einflusses dieser Einteilung auf klinische Outcome-Parameter nicht ausreichend zu beurteilen. Sicherlich weisen die absoluten Zahlenwerte innerhalb dieser Kategorien große Unterschiede auf. Betrachtet man aber in diesem Zusammenhang die Methode, mit der die Messungen durchgeführt werden, so relativiert sich dies. In die RQ-PCR-Reaktion, die ohnehin eine hoch sensitive Methode darstellt, werden jeweils nur geringste Mengen an DNA der Probenmaterialien bzw. Plasmide eingesetzt. So können sich kleinste Pipettierungenauigkeiten, bedingt durch die exponentielle Amplifikationscharakteristik und unter Beachtung der Sensitivität, enorm auswirken. Eine exakte Angabe, welche Größenordnung eines

MRD-Anstieges oder Abfalls als klinisch bzw. prognostisch relevant zu bezeichnen ist, ist aktuell nicht einheitlich definiert und sollte Gegenstand zukünftigen Untersuchungen sein.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein IGH-RQ-PCR-Assay etabliert werden, welcher auf der Verwendung klonspezifischer Plasmide als Standard zur Quantifizierung minimaler Resterkrankung (MRD) beim Follikulärem Lymphom (FL) basiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode eine sehr genaue und reproduzierbare MRD-Quantifizierung ermöglicht und im Vergleich mit den bisher etablierten und standardisierten Methoden quantitativer MRD-Diagnostik beim FL vergleichbar gute und somit klinisch verwertbare Ergebnisse liefert. Obwohl es sich dabei um ein methodisch aufwendiges Verfahren handelt konnte die praktische Anwendbarkeit im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt werden. Der vorgestellte Assay bietet somit bei Patienten mit follikulärem Lymphom die Möglichkeit, auch im Falle des Fehlens einer mittels PCR detektierbaren t(14;18)-Translokation eine quantitative MRD-Diagnostik durchzuführen und den Patienten die daraus resultierende Verbesserung der Behandlung und möglicherweise auch der Prognose zugänglich zu machen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit follikulärem Lymphom (FL), mittels quantitativer Real-Time PCR (RQ-PCR), hinsichtlich minimaler Resterkrankung (MRD) untersucht. Zielsetzung der Arbeit war es, einen auf klonenspezifischen Plasmiden basierenden RQ-PCR-Assay zur MRD-Quantifizierung zu etablieren, welcher als molekulare Zielstruktur das lymphomspezifische klonale Rearrangement des Immunglobulin-Schwerkettengens (IGH) nutzt und somit auch gerade im Falle des Fehlens einer detektierbaren t(14;18)-Translokation beim FL Verwendung finden kann. Besonderheiten im Falle des FL, wie die oftmals fehlende Möglichkeit den Tumorzellgehalt der Primärprobe zu bestimmen und daraus eine Standardkurve aus genomischer DNA (gDNA) des Primärmaterials zu adjustieren, machen die bei anderen klonalen B-Zell-Neoplasien übliche Verwendung der gDNA aus Primärmaterial zur MRD-Quantifizierung schwierig oder sogar unmöglich. Zur Umgehung dieser Limitationen sollten klonenspezifische IGH-Plasmide zur Herstellung einer Standardkurve verwendet werden.

Hierfür wurde das klonale IGH-Rearrangement von 24 Patienten und einer Zelllinie mittels IGH-PCR amplifiziert, sequenziert und analysiert und folglich die IGH-Plasmid-Standards mittels Klonierung generiert. Anhand der IGH-Analyse wurde die RQ-PCR-Strategie festgelegt, welche letztlich auf der Verwendung patientenspezifischer (ASO-) Primer und Konsensus- oder ASO-Sonden zur Amplifikation der CDR3-Region basierte.

Im Rahmen eines Zelllinien-Versuches konnte eine sehr genaue IGH-Quantifizierung anhand der Plasmid-Standards gezeigt werden. Im Rahmen der Evaluation an Materialien von Patienten mit FL (24 Pat., 109 DNA-Proben) zeigten die Plasmid-Standards gegenüber genomischer (IGH-) DNA vergleichbar gute Ergebnisse bezüglich Sensitivität (Median = 10^{-5} vs. $1,25 \cdot 10^{-5}$) und Spezifität (Median = $5 \cdot 10^{-5}$ vs. $1,41 \cdot 10^{-4}$) und eine signifikante Überlegenheit in Bezug auf die Steigung der Standardkurve (Median = -3,39 vs. -3,67; p-Wert 0,008), den Korrelationskoeffizienten (Median = 0,998 vs. 0,990; p-Wert 0,009) und die PCR-Effizienz (Median = 0,97 vs. 0,87; p-Wert = 0,008). Es konnten MRD-Niveaus der Verlaufspro-

ben mit überwiegend hoher Konkordanz vergleichend anhand der IGH-Plasmide, genomischer IGH-DNA-Standards und dem bisherigen Goldstandard beim FL, der RQ-PCR der t(14;18)-Translokation quantifiziert werden. Abschließend wurde an 14 Patienten (41 Primär- und Verlaufsproben), welche im Rahmen einer prospektiven Studie behandelt wurden, die Anwendbarkeit der IGH-Plasmid-Standards zur MRD-Diagnostik bei Fehlen einer PCR-amplifizierbaren t(14;18)-Translokation untersucht. Es konnte dabei in allen Fällen ein IGH-Plasmid-basierter RQ-PCR-Assay mit jeweils sehr guter Sensitivität (Median 10^{-5}) und Spezifität (Median $7,5 \cdot 10^{-5}$) etabliert werden und somit sämtliche Primär- und Verlaufsmaterialien zuverlässig quantifiziert werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit eine RQ-PCR-Strategie zur MRD-Diagnostik beim FL etabliert werden, welche auf der Verwendung klonspezifischer IGH-Plasmid-Standards basiert. Dieser Ansatz bietet, neben seiner praktischen Anwendbarkeit, vor allem die Möglichkeit einer exakten, zuverlässig reproduzierbaren und diesbezüglich auch mit bereits etablierten RQ-PCR-Strategien vergleichbaren MRD-Quantifizierung und stellt somit eine geeignete Alternative für die MRD-Diagnostik beim t(14;18)-negativen Follikulären Non-Hodgkin-Lymphom und anderen klonalen B-Zell-Neoplasien dar.

Literaturverzeichnis

- Aarts, WM;** Bende, RJ; Steenbergen, EJ; Kluin, PM; Ooms, EC; Pals, ST; van Noesel, CJ (2000): Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. In: *Blood* 95 (9), S. 2922–2929.
- Aster, JC;** Longtine, JA (2002): Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. In: *Am. J. Pathol.* 160 (3), S. 759–763.
- Berget, E;** Molven, A; Lokeland, T; Helgeland, L; Vintermyr, OK (2015): IGHV gene usage and mutational status in follicular lymphoma: Correlations with prognosis and patient age. In: *Leukemia research* 39 (7), S. 702–708.
- Böttcher, S;** Ritgen, M; Fischer, K; Stilgenbauer, S; Busch, RM; Fingerle-Rowson, G et al. (2012): Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis From the Randomized GCLLSG CLL8 Trial. In: *J. Clin. Oncol* 30 (9), S. 980–988.
- Brüggemann, M;** Droese, J; Bolz, I; Lüth, P; Pott, C; Neuhoff, N von et al. (2000): Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. In: *Leukemia* 14 (8), S. 1419–1425.
- Brüggemann, M;** Raff, T; Flohr, T; Gökbüget, N; Nakao, M; Droese, J et al. (2006): Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. In: *Blood* 107 (3), S. 1116–1123.
- Burrows, P;** Cooper, M (1997): B cell development and differentiation. In: *Curr Opin Immunol* 9 (2), S. 239–244.
- Campana, D** (2010): Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010, S. 7–12.
- Ciudad, J;** San Miguel, JF; López-Berges, MC; Vidriales, B; Valverde, B; Ocqueteau, M et al. (1998): Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: *J. Clin. Oncol* 16 (12), S. 3774–3781.
- Czuczman, MS;** Grillo-López, AJ; McLaughlin, P; White, CA; Saleh, M; Gordon, L et al. (2001): Clearing of cells bearing the bcl-2 [t(14;18)] translocation from blood and marrow of patients treated with rituximab alone or in combination with CHOP chemotherapy. In: *Ann. Oncol* 12 (1), S. 109–114.
- Dreyling, M** (2010): Aktuelle klinische Aspekte des follikulären Lymphoms. In: *Therapeutische Umschau* 067 (10), S. 511–516.
- Evans, PAS;** Pott, C; Groenen, PJTA; Salles, G; Davi, F; Berger, F et al. (2007): Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. In: *Leukemia* 21 (2), S. 207–214.

- Freedman, AS;** Neuberg, D; Mauch, P; Soiffer, RJ; Anderson, KC; Fisher, DC et al. (1999): Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. In: *Blood* 94 (10), S. 3325–3333.
- Galimberti, S;** Luminari, S; Ciabatti, E; Grassi, S; Guerrini, F; Dondi, A et al. (2014): Minimal Residual Disease after Conventional Treatment Significantly Impacts on Progression-Free Survival of Patients with Follicular Lymphoma: The FIL FOLL05 Trial. In: *Clinical Cancer Research* 20 (24), S. 6398–6405.
- Gimenez, E;** Chauvet, M; Rabin, L; Puteaud, I; Duley, S; Hamaidia, S et al. (2012): Cloned IGH VDJ targets as tools for personalized minimal residual disease monitoring in mature lymphoid malignancies; a feasibility study in mantle cell lymphoma by the Groupe Ouest Est d'Etude des Leucémies et Autres Maladies du Sang. In: *Br J Haematol* 158 (2), S. 186–197.
- Giudicelli, V;** Brochet, X; Lefranc, M (2011): IMGT/V-QUEST: IMGT Standardized Analysis of the Immunoglobulin (IG) and T Cell Receptor (TR) Nucleotide Sequences. In: *Cold Spring Harbor Protocols* 2011 (6), S. 695–715.
- Gribben, JG;** Freedman, AS; Neuberg, D; Roy, DC; Blake, KW; Woo, SD et al. (1991): Immunologic Purging of Marrow Assessed by PCR before Autologous Bone Marrow Transplantation for B-Cell Lymphoma. In: *N Engl J Med* 325 (22), S. 1525–1533.
- Gribben, JG;** Neuberg, D; Freedman, AS; Gimmi, CD; Pesek, KW; Barber, M et al. (1993): Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. In: *Blood* 81 (12), S. 3449–3457.
- Hiddemann, W;** Kneba, M; Dreyling, M; Schmitz, N; Lengfelder, E; Schmits, R et al. (2005): Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. In: *Blood* 106 (12), S. 3725–3732.
- Hirt, C;** Schüler, F; Kiefer, T; Schwenke, C; Haas, A; Niederwieser, D et al. (2008): Rapid and sustained clearance of circulating lymphoma cells after chemotherapy plus rituximab: clinical significance of quantitative t(14;18) PCR monitoring in advanced stage follicular lymphoma patients. In: *Br. J. Haematol.* 141 (5), S. 631–640.
- Hitz, F;** Ketterer, N; Lohri, A; Mey, U; Pederiva, S; Renner, C et al. (2011): Diagnosis and treatment of follicular lymphoma. In: *Swiss Med Wkly* 141 (11), w13247.
- Hummel, M;** Bentink, S; Berger, H; Klapper, W; Wessendorf, S; Barth, TFE et al. (2006): A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. In: *N. Engl. J. Med.* 354 (23), S. 2419–2430.
- Jaffe, ES** (2009): The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. In: *Hematology* 2009 (1), S. 523–531.

- Katzenberger, T;** Ott, G; Klein, T; Kalla, J; Müller-Hermelink, HK; Ott, MM (2004): Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. In: *Am. J. Pathol.* 165 (2), S. 481–490.
- Ladetto, M;** Lobetti-Bodoni, C; Mantoan, B; Ceccarelli, M; Boccomini, C; Genuardi, E et al. (2013): Persistence of minimal residual disease in bone marrow predicts outcome in follicular lymphomas treated with a rituximab-intensive program. In: *Blood* 2013 122 (23), S. 3759–3766
- Ladetto, M;** De Marco, F; Benedetti, F; Vitolo, U; Patti C, Rambaldi A et al. (2008): Prospective, multicenter randomized GITMO/IIL trial comparing intensive (R-HDS) versus conventional (CHOP-R) chemoimmunotherapy in high-risk follicular lymphoma at diagnosis: the superior disease control of R-HDS does not translate into an overall survival advantage. In: *Blood.* 111 (8), S. 4004–4013.
- Ladetto, M;** Benedetti, F; Vitolo, U; Patti, C; Rambaldi, A; Liberati, A et al. (2006): Rituximab-supplemented high-dose sequential chemotherapy (R-HDS) has better EFS and PFS than R-CHOP in poor risk follicular lymphoma (FL) at diagnosis: A multicenter randomized GITMO/IIL trial. In: *J Clin Oncol.* 24 (18), S. 7525.
- Ladetto, M;** Donovan, JW; Harig, S; Trojan, A; Poor, C; Schlossnan, R et al. (2000): Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. In: *Biol. Blood Marrow Transplant* 6 (3), S. 241–253.
- Lefranc, M** (2003a): IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis. In: *Leukemia* 17 (1), S. 260–266.
- Lefranc, M** (2003b): IMGT, the international ImmunoGeneTics database. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (1), S. 307–310.
- Leich, E;** Ott, G; Rosenwald, A (2011): Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. In: *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24 (2), S. 95–109.
- Lo Coco, F;** Gaidano, G; Louie, DC; Offit, K; Chaganti, RS; Dalla-Favera, R (1993): p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. In: *Blood* 82 (8), S. 2289–2295.
- Lobetti-Bodoni, C;** Mantoan, B; Monitillo, L; Genuardi, E; Drandi, D; Barbero, D et al. (2013): Clinical implications and prognostic role of minimal residual disease detection in follicular lymphoma. In: *Therapeutic Advances in Hematology* 4 (3), S. 189–198.
- Lopez-Guillermo, A** (1998): The Clinical Significance of Molecular Response in Indolent Follicular Lymphomas. In: *Blood* (91), S. 2955–2960.
- Metzner, B;** Müller, TH; Gebauer, W; Casper, J; Kraemer, D; Rosien, B et al. (2014): Long-term clinical and molecular remissions in patients with mantle cell lymphoma following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. In: *Ann Hematol* 93 (5), S. 803–810.

- Metzner, B;** Pott, C; Muller, TH; Gebauer, W; Casper, J; Kraemer, D et al. (2013): Long-term clinical and molecular remissions in patients with follicular lymphoma following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. In: *Annals of Oncology* 24 (6), S. 1609–1615.
- Miyazaki, T;** Fujita, H; Fujimaki, K; Hosoyama, T; Watanabe, R; Tachibana, T et al. (2012): Clinical significance of minimal residual disease detected by multidimensional flow cytometry: Serial monitoring after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. In: *Leukemia research*. 36 (8), S. 998–1003.
- Moos, M;** Schulz, R; Martin, S; Benner, A; Haas, R (1998): The remission status before and the PCR status after high-dose therapy with peripheral blood stem cell support are prognostic factors for relapse-free survival in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma. In: *Leukemia* 12 (12), S. 1971–1976.
- Ott, G;** Katzenberger, T; Lohr, A; Kindelberger, S; Rüdiger, T; Wilhelm, M et al. (2002): Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. In: *Blood* 99 (10), S. 3806–3812.
- Pongers-Willemse, MJ;** Verhagen, OJ; Tibbe, GJ; Wijkhuijs, AJ; Haas, V de; Roovers, E et al. (1998): Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. In: *Leukemia* 12 (12), S. 2006–2014.
- Pott, C** (2011): Minimal Residual Disease Detection in Mantle Cell Lymphoma: Technical Aspects and Clinical Relevance. In: *Seminars in Hematology* 48 (3), S. 172–184.
- Pott, C;** Hoster, E; Delfau-Larue, MH; Beldjord, K; Bottcher, S; Asnafi, V et al. (2010): Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. In: *Blood* 115 (16), S. 3215–3223.
- Rambaldi, A;** Carlotti, E; Oldani, E; Della Starza, I; Baccarani, M; Cortelazzo, S et al. (2005): Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 105 (9), S. 3428–3433.
- Rambaldi, A;** Lazzari, M; Manzoni, C; Carlotti, E; Arcaini, L; Baccarani, M et al. (2002): Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. In: *Blood* 99 (3), S. 856–862.
- Salles, GA** (2007): Clinical Features, Prognosis and Treatment of Follicular Lymphoma. In: *Hematology* 2007 (1), S. 216–225.
- Stamatopoulos, K;** Kosmas, C; Belessi, C; Stavroyianni, N; Kyriazopoulos, P; Papadaki, T (2000): Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. In: *Immunol Today* 21(6), S. 298–305
- Swerdlow, SH;** Campo, E; Harris, NL; et al. (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, 2008, Lyon, France

- Szczepanski, T**; Orfão, A; van der Valden, VHJ; Miguel, JFS; van Dongen, JJM (2001): Minimal residual disease in leukemia patients. In: *Lancet Oncology* 2 (7), S. 409–417.
- Tonegawa, S** (1983): Somatic generation of antibody diversity. In: *Nature* 302 (5909), S. 575–581.
- van der Velden, VHJ**; Cazzaniga, G; Schrauder, A; Hancock, J; Bader, P; Panzer-Grumayer, ER et al. (2007): Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. In: *Leukemia* 21 (4), S. 604–611.
- van der Velden, VHJ**; Hochhaus, A; Cazzaniga, G; Szczepanski, T; Gabert, J; van Dongen, JJM (2003): Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. In: *Leukemia* 17 (6), S. 1013–1034.
- van Dongen, JJM**; Langerak, AW; Brüggemann, M; Evans, PAS; Hummel, M; Lavender, FL et al. (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. In: *Leukemia* 17 (12), S. 2257–2317.
- Viardot, A**; Möller, P; Högel, J; Werner, K; Mechttersheimer, G; Ho, AD et al. (2002): Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. In: *J. Clin. Oncol.* 20 (23), S. 4523–4530.
- Yang, E**; Korsmeyer, SJ (1996): Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. In: *Blood* 88 (2), S. 386–401.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1 Schematische Darstellung eines IGH-VDJ-Rearrangement mit Bindungsstellen der Gensegmentfamilien-spezifischen FR1-, FR2- und FR3-Primer sowie des JHconsensus-Primer; nach van Dongen et al. 2003 14
- Abbildung 3.1 Häufigkeiten der verwendeten IGHV-Gensegmente der untersuchten klonalen IGH-Rearrangements von 27 Pat. mit FL (gesamte Säule) und der detektierten mittleren Mutationsfrequenzen bezogen auf die jeweiligen IGHV-Gensegmente (gestrichelter Anteil der Säule mit Prozent-Angabe).....36
- Abbildung 3.2 Darstellung der Häufigkeiten der verwendeten IGHV-Gensegmentfamilien der untersuchten klonalen IGH-Rearrangements von 27 Pat. mit FL36
- Abbildung 3.3 Standardkurven des IGH-Plasmid- und genomischen DNA-Standard der Zelllinie RAMOS; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs39
- Abbildung 3.4 Quantifizierung der RAMOS gDNA-Verdünnungen am Plasmid-Standard; IGH-Kopien gemessen (Mittelwerte bei 3-fach Ansätzen) = am Plasmid-Standard quantifizierte IGH-Kopien der jew. gDNA-Verdünnungsstufe; IGH-Kopien erwartet = rechnerisch anhand der eingesetzten DNA-Menge zu erwartende IGH-Kopien in den jew. gDNA-Verdünnungsstufen 40
- Abbildung 3.5 Lineare Regression der Daten aus Abb. 3.8; R^2 = Pearson-Korrelationskoeffizient; x-Achse = logarithmische Darstellung der rechnerisch zu erwartenden IGH-Kopien; y-Achse = logarithmische Darstellung der mittels IGH-RQ-PCR quantifizierten IGH-Kopien 41
- Abbildung 3.6 Standardkurven der IGH-Plasmid-Standards der Patienten UPN 1-24; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs 42
- Abbildung 3.7 Standardkurven der IGH-genomischen DNA-Standards der Patienten UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10; x-Achse = logarithmische Darstellung der IGH-Kopien, y-Achse = CT-Wert; dargestellt sind jeweils nur Messwerte innerhalb des quantitativen Messbereichs 44
- Abbildung 3.8 Vergleich der Charakteristika der IGH-Plasmid und genomischen DNA-Standards (UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10); oben-links: Pearson-Korrelationskoeffizienten der Standardkurven; oben-rechts: Steigungen der Standardkurven; unten-links: Effizienzen der RQ-PCR-Assays; Box-Whisker-Plots: Oberes bzw. unteres Ende der Box = oberes bzw. unteres Quartil, Querstrich in der Box = Median, Ende der Whisker = 1,5-facher

Interquartilsabstand, *** = signifikant überlegener Standard, ○ = Ausreißer; p-Werte nach Wilcoxon-Test angegeben...45

Abbildung 3.9 MRD-Niveaus der Patientenproben (UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10) quantifiziert mit IGH-Plasmid-Standard und genomischem DNA (gDNA)-Standard oder/ und t(14;18)-Standard; P1, 2, 3, ..., Pn = Patientenproben zum Zeitpunkt 1, 2, 3, ..., n; pos_nq = positiv aber außerhalb des quantifizierbaren Messbereiches, neg = negativ 48

Abbildung 3.10 MRD-Verläufe von 14 Patienten (UPN 11-24), SCR = Screening, C4D1 = 1. Tag des 4. Chemotherapie-Zyklus, EOI = End of Induction, pos_nq = positiv aber außerhalb des quantifizierbaren Messbereiches, neg = negativ50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Primersequenzen der FR1- und des JHconsensus-Primer, sense = Vorwärtsprimer, antisense = Rückwärtsprimer	14
Tabelle 2.2 Pipettieransatz der FR1-IGH-PCR.....	15
Tabelle 2.3 Cycling-Bedingungen der FR1-IGH-PCR.....	15
Tabelle 2.4 Pipettieransatz der IGH-Sequenzierung.....	18
Tabelle 2.5 Cycling-Bedingungen IGH-Sequenzierung.....	18
Tabelle 2.6 Primer der M13-Sequenzierung, FP = Vorwärts-Primer (engl. forward primer), RP = Rückwärts-Primer (engl. reverse primer)	20
Tabelle 2.7 Pipettieransatz der IGH-RQ-PCR; ASO = allelspezifisches Oligonukleotid, VP = Vorwärtsprimer, RP = Rückwärtsprimer, BSA = Bovines Serumalbumin	28
Tabelle 2.8 Cycling-Bedingungen der IGH-RQ-PCR	29
Tabelle 2.9 Pipettieransatz der Albumin-RQ-PCR, VP = Vorwärts-Primer, RP = Rückwärtsprimer	30
Tabelle 2.10 Cycling-Bedingungen der Albumin-RQ-PCR	31
Tabelle 3.1 Sequenzen der CDR3-Regionen, verwendete VH-Gensegmente und VH-Mutationsfrequenzen von 27 Patienten und der Zelllinie RAMOS (5'-3'-Orientierung); IGH-Rearrangement = verwendete Segmente der VH, DH-, und JH-Familien; *angegeben sind nur die letzten 20 Basen des VH und die ersten 20 Basen des JH-Segmentes; N1, N2 = Insertionen beim Rearrangement; DEL = Deletionen beim Rearrangement im Bereich der Junctionstellen; Bindungsstellen der spezifischen ASO-Rückwärts-Primer sind in grün und unterstrichen angegeben.....	35
Tabelle 3.2 Sequenzen der Primer und Sonden für die IGH-RQ-PCR von 24 Patienten (UPN 1-24) und der Zelllinie; ASO = allelspezifisches Oligonukleotid; FR3-Konsensus-Sonden: Bezeichnung der Sonde in Klammern; alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.....	38
Tabelle 3.3 Charakteristika der Standardkurven (IGH-Plasmid- und genomischer DNA-Standards) der Zelllinie RAMOS; R^2 = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{(-1/Slope)-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation, **QR = quantitativer Messbereich (engl. quantitative range)	39
Tabelle 3.4 Charakteristika der IGH-Plasmid-Standards der Patienten UPN 1 - 24; R^2 = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{(-1/Slope)-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation (wenn negativ = neg., wenn positiv = CT-Wert), **QR = quantitativer	

Messbereich (engl. quantitative range), gestrichelte Linie trennt die Studien „GLSG 2000“ und „GADOLIN“ 43

Tabelle 3.5 Charakteristika der genomischen (IGH-) DNA-Standards der Patienten UPN 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10; R^2 = Pearson-Korrelationskoeffizient, *Effizienz = Effizienz der PCR-Reaktion [$E=10^{-(1/Slope)-1}$], Buffy Coat = Kontrolle auf unspezifische Amplifikation **QR = quantitativer Messbereich (engl. quantitative range); graue Buchstaben: Assay erfüllt nicht EuroMRD-Kriterien; fett gedruckt: Werte, die die EuroMRD-Kriterien nicht erfüllen (van der Velden et al. 2007) 44

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. Michael Kneba, als Direktor stellvertretend für die Klinik für Innere Medizin II des UKSH, Campus Kiel, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotionsarbeit.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Christiane Pott für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung während der experimentellen Durchführung dieser Arbeit und die Korrektur der Dissertation.

Ganz herzlich danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Hämatologie Labor Kiel, Sektion für hämatologische Spezialdiagnostik, Klinik für Innere Medizin II des UKSH, Campus Kiel, für die jederzeit freundliche, hilfsbereite und konstruktive Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer persönlicher Dank Ariane Stuhr und Anne-Wiebke Kruse, Petra Chall, Dr. Heiko Trautmann, Dr. Marc Füllgrabe, Dr. Britta Kehden und Dr. Henrik Knecht, die mit geduldigen Instruktionen und Hilfestellungen beim Erlernen der notwendigen Laborfertigkeiten, dem Bedienen der Geräte sowie der Durchführung der Experimente und immer wieder auch mit Ratschlägen und Unterstützung bei inhaltlichen, methodischen und statistischen Fragestellungen sowie deren Umsetzung entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern Renate und Bodo, meiner Schwester Tanja sowie bei meiner lieben Laura und meiner Tochter Neele für die Ermöglichung, das Vertrauen sowie die bedingungslose und geduldige Unterstützung während der Erstellung dieser Doktorarbeit bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Laubenstein
 Vorname: Tobias
 Adresse: Scharnhorststraße 15
 24105 Kiel
 Geburtsdatum: 04.05.1983

Ausbildung und Abschlüsse

08/1993 - 06/2002 Nordseegymnasium, St. Peter-Ording, Abitur
 10/2003 - 09/2006 Klinikum Nordfriesland, Husum, Staatlich Examinierter Gesundheits- und Krankenpfleger
 10/2006 - 10/2012 CAU Kiel, Studium der Humanmedizin, 2. Staatsexamen im Oktober 2012

Berufliche Tätigkeit und Promotion

01/2010 - heute Promotionsarbeit mit dem Thema „Klonspezifische IGH-Plasmide als alternativer Standard zur Quantifizierung minimaler Resterkrankung mittels Real-Time PCR beim Follikulären Non-Hodgkin Lymphom“, Sektion für hämatologische Spezialdiagnostik, Klinik für Innere Medizin II, Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel, Direktor Prof. Dr. Dr. Kneba, Betreuerin Prof. Dr. Pott.

01/2013 - heute Assistenzarzt zur Weiterbildung im Bereich Innere Medizin und Hämatologie und Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel, Direktor Prof. Dr. Dr. Kneba.

Publikationen

Abstract und e-Poster auf dem 21. Jahreskongress der European Hematology Association (EHA), Kopenhagen, Juni 2016; Abstract E1161; (Abstract release date: May 19, 2016)
EHA Learning Center. Laubenstein T. Jun 9, 2016; 132710:

„CLONE-SPECIFIC IGH PLASMIDS AS AN ALTERNATIVE STANDARD FOR ASSESSMENT OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE BY REAL-TIME QUANTITATIVE PCR IN FOLLICULAR LYMPHOMA“

Autoren: Tobias Laubenstein¹, Michael Kneba¹, Christiane Pott¹ (¹Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Germany)

