

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 Kiel

**Molekulargenetische Charakterisierung
klonaler Immunoglobulin-Rearrangements
und Bestimmung von minimaler Resterkrankung
bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen
der B-Zell-Reihe**

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

vorgelegt von

Matthias von Hofen

aus Aurich

Kiel 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Michael Kneba

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 31.03.2018

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Grundlagen | 1 |
| 1.2 | Aufgabenstellung | 8 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 2.1 | Untersuchungsmaterial | 9 |
| 2.2 | Materialaufbereitung..... | 9 |
| 2.2.1 | Kernpräparation | 9 |
| 2.2.2 | DNA-Extraktion | 9 |
| 2.2.3 | DNA-Gewinnung aus Paraffinschnitten | 10 |
| 2.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 10 |
| 2.3.1 | IgH-CDR3-Konsensus-PCR | 10 |
| 2.3.2 | β -Actin-PCR | 12 |
| 2.3.3 | Agarosegelelektrophorese..... | 13 |
| 2.4 | Fragmentanalyse | 13 |
| 2.4.1 | PCR-Fragmentanalyse mittels Genescanning..... | 13 |
| 2.4.2 | Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) von IgH-CDR3-PCR-Produkten | 15 |
| 2.5 | Klonierung | 19 |
| 2.5.1 | Vorbereitung der einzelnen Komponenten | 19 |
| 2.5.1.1 | Restriktionsverdau von pUC19 Plasmid mit EcoRI, Bam HI und HindIII | 19 |
| 2.5.2 | Klonierung von IgH-CDR3-PCR-Produkten..... | 20 |
| 2.6 | Sequenzierung..... | 21 |
| 2.6.1 | Cycle Sequencing | 22 |
| 2.7 | Patientenspezifische PCR (N-PCR)..... | 24 |
| 2.7.1 | Prinzip..... | 24 |
| 2.7.2 | Konstruktion der allel-spezifischen Oligonukleotide | 25 |
| 2.7.3 | Bedingungen für die N-PCR..... | 26 |
| 2.7.4 | Semiquantitative N-PCR | 27 |
| 2.8 | Puffer, Lösungen, Medien | 29 |
| 3. | ERGEBNISSE | 32 |
| 3.1 | IgH-CDR3-PCR mit Konsensus-Primern..... | 32 |
| 3.2 | PCR-Fragmentanalyse mittels Genescanning..... | 35 |
| 3.2.1 | Vergleich der Detektionsraten in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien | 36 |
| 3.2.2 | Vergleich der Detektionsraten in Abhängigkeit vom klinischen Ausbreitungsstadium..... | 37 |
| 3.2.3 | Vergleich der Detektionsraten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp..... | 39 |
| 3.3 | Sequenzierung..... | 40 |
| 3.3.1 | Direkte Sequenzierung..... | 41 |
| 3.3.2 | Sequenzierung nach PCR-TGGE | 41 |
| 3.3.3 | Sequenzierung nach PCR-Klonierung | 42 |
| 3.3.4 | Analyse der sequenzierten IgH-CDR3-Regionen..... | 44 |
| 3.4 | Patientenspezifische N-PCR | 44 |
| 3.4.1 | Auswahl der allel-spezifischen Oligonukleotide | 44 |
| 3.4.2 | Prüfung der Spezifität der Patienten-spezifischen Oligonukleotide | 45 |
| 3.4.3 | Semiquantitative PCR..... | 46 |
| 4. | DISKUSSION | 51 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 70 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 72 |
| 7. | ANHANG | 85 |
| 8. | DANKSAGUNG | 92 |
| 9. | LEBENS LAUF | 93 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|---|
| A | Adenin |
| ABC | activated B-Cell (aktivierte B-Zelle) |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| ASO | allel-spezifisches Oligonukleotid |
| Bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| C _H | konstante Region des Immunglobulin-Schwerkettengens |
| °C | Grad Celsius |
| CD | cluster of differentiation |
| CDR | complementarity determining region (Komplementarität- bestimmende Region) |
| CHO(E)P | Cyclophosphamid, Hydroxydaunomycin (Doxorubicin), Oncovirin (Vincristin), Etoposid, Prednison |
| CLL | chronische lymphatische Leukämie |
| CR | complete remission (komplette Remission) |
| D _H | Diversitätsregion des Immunglobulin-Schwerkettengens |
| ddNTP | dideoxyNukleosidtriphosphat |
| DLBCL | diffuse large B-cell lymphoma (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom) |
| DMF | Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxyNukleosidtriphosphat |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| E. coli | Escheria coli |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| et al. | et alii (und andere) |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FCM | Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantrone |
| FL | follikuläres Lymphom |
| FR | framing region |

| | |
|----------------|---|
| g | gravity (Schwerkraft) |
| G | Guanin |
| GCB | germinal center B-cell |
| ggf. | gegebenenfalls |
| h | Stunde |
| HHV-6 | humanes Herpes-Virus 6 |
| HMW | high molecular weight |
| IgH | schwere Kette des Immunglobulins |
| IPI | international prognostic index |
| J _H | Junktionsregion des Immunglobulin-Schwerkettengens |
| Kde | Kappa-deleting element |
| KM | Knochenmark |
| KMT | Knochenmarktransplantation |
| LAP | Leukaphereseprodukt |
| LBL | lymphoblastisches Lymphom |
| LK | Lymphknoten |
| log | Logarithmus |
| MCL | mantle cell lymphoma (Mantelzelllymphom) |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μl | Mikroliter |
| MIZE | Ifosfamid-Mesna, Idarubicin, Etoposid |
| MM | Multiples Myelom |
| MRD | minimal residual disease (minimale Resterkrankung) |
| MZL | Marginalzonenlymphom |
| N | non-template Nukleotid (hypervariabler Abschnitt unterschiedlicher Zusammensetzung und Länge) |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NK-Zelle | natural-killer-Zelle |
| OD | optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |

| | |
|--------|--|
| PB | peripheres Blut |
| PBSCT | peripheral blood stem cell transplantation (periphere Blutstammzell-transplantation) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PR | partielle Remission |
| PSC | peripheral stem cells (periphere Blutstammzellen) |
| q | langer Arm eines Chromosoms |
| RAG | Rekombinase-aktivierendes Gen |
| RFU | relative fluorescence unit (relative Fluoreszenzaktivität) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| Rpm | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute) |
| RQ-PCR | Real-time quantitative PCR |
| RSP | reverse sequencing primer |
| SCT | stem cell transplantation (Stammzelltransplantation) |
| Sec | Sekunde |
| SLL | small lymphocytic lymphoma |
| s.u. | siehe unten |
| t(x;x) | Chromosomentranslokation |
| T | Thymin |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TCR | T-cell receptor (T-Zellrezeptor) |
| TdT | terminale Desoxynukleotidyl Transferase |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGGE | Temperaturgradienten Gelelektrophorese |
| USP | Universal Sequencing Primer |
| u.U. | unter Umständen |
| UV | ultraviolett |
| V | variable (Variabilitätssegment) |
| v.a. | vor allem |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| z.T. | zum Teil |

1. EINLEITUNG

1.1 Grundlagen

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bilden eine sehr heterogen zusammengesetzte Gruppe maligner lymphoproliferativer Erkrankungen, deren Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen hat, ohne dass sich dies vollständig durch den Anstieg der allgemeinen Lebenserwartung oder durch eine verbesserte Diagnostik erklären lässt (SEER Database, National Cancer Institute, 2011). Mehr als die Hälfte der Patienten ist bei Ausbruch der Erkrankung über 65 Jahre alt.

Die Klassifizierung der NHL erfolgt nach histomorphologischen, immunologischen und, in einem zunehmenden Maße, nach zytogenetischen und molekulargenetischen Kriterien. In der aktuellen WHO-Klassifikation (Swerdlow et al. 2008) unterscheidet man zwischen B-Zell- und T-Zell-NHL sowie, entsprechend dem klinischen Verlauf, zwischen indolenten, aggressiven und sehr aggressiven Lymphomen. Die Gruppe der aggressiven Lymphome umfasst wiederum eine Vielzahl zytologischer Varianten und verschiedener klinischer bzw. morphologischer Subtypen. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist dabei das am häufigsten vorkommende aggressive NHL und macht ca. 30-40% aller NHL-Erkrankungen weltweit aus (Harris et al. 1999). Prinzipiell können DLBCL de novo oder sekundär aus einem präexistenten oder simultanen indolenten Lymphom entstehen. Ein Extranodalbefall liegt initial bei mehr als 50% der Patienten vor, eine primäre Knochenmarkinfiltration lässt sich histologisch in 16% der Fälle nachweisen. Eine B-Symptomatik tritt bei ca. 20% der Patienten auf. Die Stadieneinteilung aggressiver Lymphome erfolgt gemäß der Ann Arbor-Kriterien entsprechend der klinisch bzw. radiologisch nachgewiesenen Ausbreitung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. eines Rezidivs.

Der Tatsache, dass es sich bei den DLBCL weniger um eine einheitliche Entität, als vielmehr um eine recht heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt, wird in der WHO-Klassifikation dadurch Rechnung getragen, dass sowohl besondere morphologische Varianten (z.B. centroblastisch, immunoblastisch, anaplastisch) als auch besondere klinische Subtypen (z.B. mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom, intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom, primäres Körperhöhlen-/Erguß-Lymphom) sowie molekulare Subgruppen (GCB- und ABC-Subtypen, s.u.) ausgewiesen werden.

Aggressive Lymphome zeigen einen rasch progredienten Verlauf und führen unbehandelt innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tode. Aufgrund ihres guten Ansprechens auf Chemotherapie und Strahlentherapie können auch in den fortgeschrittenen Stadien dauerhafte Remissionen und Heilungen erzielt werden. Aus diesem Grunde erfolgt die Behandlung unabhängig vom Alter des Patienten grundsätzlich in kurativer Intention. Mit konventionellen Chemotherapie-Protokollen betrug die Rate an kompletten Remissionen 60-70%, der Anteil an Langzeitremissionen bzw. Heilungen lag allerdings nur bei 30-50%. Mit dem Einsatz des monoklonalen anti-CD20-Antikörpers Rituximab in Kombination zur Chemotherapie kam es zu einer deutlichen Verbesserung des therapeutischen Ansprechens, des Progressionsfreien- und Langzeitüberlebens, beispielsweise bei Patienten über 60 Jahre zu einem um 16% verbesserten 10-Jahres-Überleben (Coiffier et al. 2010). Allerdings ist weiterhin bei 10-15% der Patienten eine primäre Therapierefraktärität zu konstatieren, und weitere 20-25% erleiden nach initialem Ansprechen ein Rezidiv, zumeist innerhalb der ersten drei Jahre. 7% aller Rezidive treten erst nach mehr als fünf Jahren auf (Coiffier et al. 2010). Die Prognose dieser refraktären bzw. relabierten Patienten ist schlecht. Weniger als 10% der primär refraktären Patienten erreichen mit einer sog. Salvage-Therapie eine anhaltende Remission (Hitz et al. 2010). Die Behandlung der Wahl im Falle eines Chemotherapie-sensitiven Rezidivs ist eine Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation, für die allerdings nur etwa die Hälfte der Patienten aufgrund des Alters oder der Komorbidität geeignet erscheint (Sehn 2012). Mehr als 70% der Patienten profitieren nicht dauerhaft von einer Salvage-Therapie (Gisselbrecht 2012).

Aufgrund dessen besteht die dringende Notwendigkeit, diejenigen Patienten frühzeitig zu identifizieren, die nur unzureichend auf die Primärtherapie ansprechen (werden) oder ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen, um die Möglichkeit einer frühzeitigen Therapieintensivierung oder einer präemptiven Remissions-reinduzierenden Behandlung evaluieren zu können (sog. „risk-adapted“ bzw. „response-adapted therapy“)

Im sog. „International Prognostic Index“ (IPI) wurden 1993 fünf prätherapeutische Parameter als unabhängige Prognosefaktoren zusammengefasst: Patientenalter > 60 Jahre, ein Stadium III/IV nach Ann Arbor, zwei oder mehr extranodale Manifestationen, eine erhöhte Serum-Laktatdehydrogenase (LDH) sowie eine reduzierter Allgemeinzustand (ECOG-Performance-Status ≥ 2 bzw. Karnofsky-Index < 70%) (Shipp et al. 1993). Je nach Zahl der vorhandenen Risikofaktoren können bei Patienten mit aggressiven Lymphomen entsprechend diesem

„International Prognostic Index“ (IPI) vier Risikogruppen unterschieden werden, deren Remissions- und Überlebensraten sich signifikant unterscheiden (niedriges Risiko, intermediär-niedriges Risiko, intermediär-hohes Risiko, hohes Risiko). Für Niedrigrisiko-Patienten liegt die Rate an kompletten Remissionen (CR) bei 87% und das 5-Jahres-Überleben bei 73%, für Hochrisiko-Patienten sind die entsprechenden Zahlen 44 bzw. 26%. Bei diesen Daten handelt es sich um retrospektive Analysen aus der Zeit vor 1993. Zwischenzeitlich haben vor allem der Einsatz von Rituximab sowie der Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation zu einer erheblichen Verbesserung der Ansprech- und Überlebensraten geführt, ohne dass dies relevante Auswirkungen auf die prognostische Aussagekraft des IPI hat (Ziepert et al. 2010). Da sich ≥ 2 extranodale Manifestationen nur bei Patienten über 60 Jahre als unabhängiger prognostischer Risikofaktor herausgestellt haben, gilt für Patienten unter 60 Jahre der altersadjustierte (aa)IPI mit den Risikofaktoren LDH-Erhöhung, Stadium III/IV und ECOG-Performance-Status ≥ 2 . Im aaIPI ist somit bereits das Vorliegen eines einzigen Risikofaktore prognostisch relevant.

Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen wie z.B. die Mikroarray-Technologie haben in den letzten Jahren zu einem besseren Verständnis dieser molekularen Heterogenität geführt. Durch die Identifizierung prognoseassoziierter Genexpressionsprofile (GEP) wurde ein genexpressionsbasiertes Überlebensmodell für DLBCL entwickelt, bei dem zwischen einem Keimzentrumstyp (GCB) und einem aktivierten B-Zell-Typ (ABC) unterschieden wird (Rosenwald et al. 2002). Eine Korrelation zwischen diesen GEP-Subgruppen und den morphologisch definierten Subentitäten der WHO-Klassifikation besteht nicht. Bei einer Anthrazyklin-basierten Chemotherapie ist der GCB-Typ mit einem besseren, der ABC-Typ mit einem schlechten Überleben assoziiert (5-Jahres-Überleben 60% bzw. 35%; Rosenwald et al. 2002, Lossos et al. 2004). Dieser Unterschied bleibt auch bei dem Einsatz Rituximab-haltiger Therapien bestehen (3-Jahres-PFS 73% bzw. 40%; Lenz et al. 2008). Diese Genexpressionsprofile haben eine vom IPI unabhängige prognostische Bedeutung (Shipp et al. 2002). Ihr tatsächlicher Stellenwert muss allerdings noch in prospektiven Studien bestätigt werden.

Die Unzulänglichkeit dieser prätherapeutisch erhobenen klinischen und molekularen Risikofaktoren, verlässlich das Ansprechen auf eine spezifische Therapie vorherzusagen, reflektiert einerseits die dargestellte genetische und biologische Heterogenität der DLBCL

und unterstreicht andererseits die Notwendigkeit für die Definition präziserer, patientenspezifischerer und biologischer Risikofaktoren (Sweetenham 2005).

Die Festlegung des Ausbreitungsstadiums, die Beurteilung der Therapieeffektivität und der Qualität einer erreichten Remission basieren auf konventionellen Methoden wie der physikalischen Untersuchung, bildgebenden Verfahren und der morphologischen Untersuchung von Knochenmarkbiopsien oder von nach der Therapie verbliebenden residuellen Lymphomen. Moderne immunologische Verfahren wie die Durchflußzytometrie (FACS) oder molekularbiologische Methoden wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) erlauben den Nachweis von Tumorzellpopulationen mit einer erheblich gesteigerten Sensitivität und Spezifität. Experimentelle Befunde und Modellberechnungen weisen darauf hin, dass mit den konventionellen Verfahren bis zu 10^8 Lymphomzellen dem diagnostischen Nachweis entgehen. Diese residuellen Tumorzellen sind ein Reservoir für die Entstehung von Rezidiven. Über die Kinetik der minimalen Resterkrankung („minimal residual disease“, MRD) während der Therapie, vom Erreichen einer klinischen Remission an und bis zum eventuellen Auftreten eines klinischen Rezidivs (siehe Abbildung 1) ist nur wenig bekannt. Aus dieser diagnostischen Blindheit resultieren klinische Therapiestrategien, die nicht zwischen den einzelnen Patienten in Abhängigkeit vom Ausmaß ihrer residuellen Erkrankung unterscheiden. In Ergänzung zu den *prätherapeutischen* Prognosefaktoren des IPI und den Genexpressionsanalysen sind sensitivere und spezifischere diagnostische Methoden erforderlich, die es ermöglichen, Einblicke in die Biologie, das Ausmaß und die Kinetik dieser minimalen Resterkrankung *während und im Anschluß* an eine Therapie zu gewinnen. Damit wäre es zukünftig eventuell möglich, die Intensität und die Dauer der Therapie individueller zu steuern und den Therapieerfolg bei einzelnen Patienten vorherzusagen.

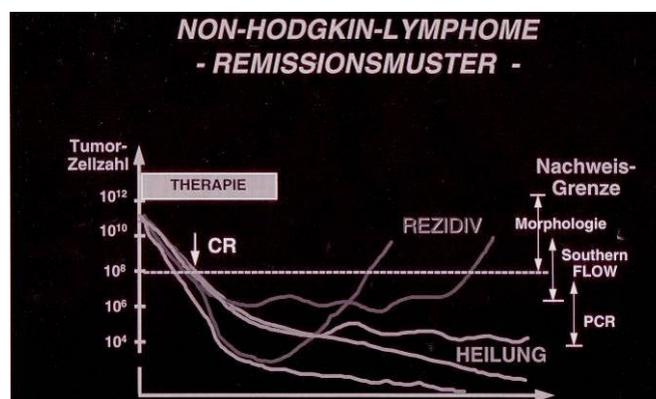


Abbildung 1: Remissionsmuster und MRD-Verhalten bei Lymphomen.

Die Charakterisierung und Identifizierung spezifischer Genumlagerungen und Chromosomentranslokationen mit Hilfe neuer molekularbiologischer Methoden hat nicht nur Einblicke in die Pathogenese der NHL erlaubt; gleichzeitig bilden die dabei gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für einen neuen diagnostischen Zugang zu den malignen Lymphomen. Das Vorhandensein spezifischer Chromosomentranslokationen ist allerdings auf bestimmte Subtypen der NHL beschränkt, von denen die meisten zur Gruppe der indolenten Lymphome zählen. Eine Translokation von BCL2 (t(14;18)) findet sich in 20-30% der Fälle auch bei DLBCL. Bei etwa 10% der Fälle ist ein chromosomaler Bruchpunkt im MYC-Lokus nachweisbar. BCL6-Rearrangements (3q27) sind mit 20-35% die bei DLBCL am häufigsten nachgewiesenen genetischen Aberrationen, ihre prognostische Relevanz wird jedoch kontrovers beurteilt (Rosenwald et al. 2006). Prospektive Untersuchungen liegen dafür noch nicht vor. Außerdem ist durch die Lokalisation der Bruchpunkte, die sich über einen weiten Bereich erstrecken, und durch eine hohe Rate an somatischen Hypermutationen die molekulargenetische Diagnostik erschwert (Arber 2000).

In dieser Situation bietet sich der Nachweis lymphozytenspezifischer Rearrangements der Antigenrezeptorgene zur molekularen Charakterisierung maligner Lymphome sowie zur Detektion klonal expandierter Zellen an.

Die Funktionsfähigkeit und extrem große Variabilität dieser Strukturen im Rahmen von Immunreaktionen wird durch ein physiologisches Rearrangement der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor (TCR)-Gene während der Ontogenese lymphatischer Zellen erreicht (Abbildung 2).

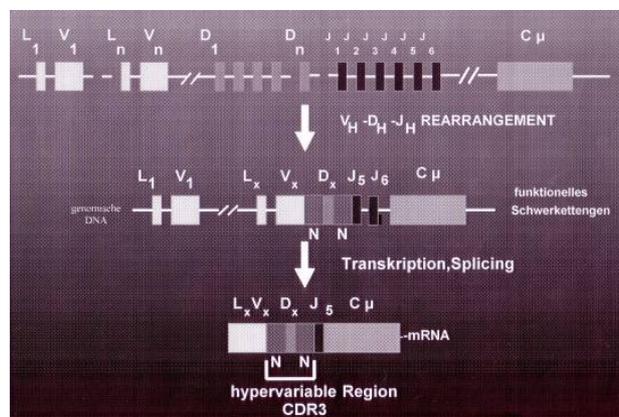


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des IgH-Schwerkettengens und Darstellung der Entstehung eines IgH-Genrearrangements

In seiner sogenannten Keimbahnkonfiguration besteht das Gen, das auf Chromosom 14 für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH) kodiert, aus 9 C_H („constant“)-, 6 J_H („joining“)-, ungefähr 23 D_H („diversity“)- und 38-46 funktionellen V_H („variable“)-Gensegmenten, von denen letztere wiederum auf der Grundlage einer mindestens 80%-igen Nukleotidsequenzhomologie 7 verschiedenen Familien zugeordnet werden. Die einzelnen Segmente sind durch nichtkodierende Abschnitte (Introns) voneinander getrennt. In dieser Keimbahnkonfiguration ist das Immunglobulin nicht funktionsfähig.

Die Keimbahn-V_H-Domäne kodiert für drei relativ hochkonservierte Bereiche („framing regions“, FR) und zwei Bereiche mit einer hohen Sequenzvariabilität, die für die Antigenerkennung wichtig sind („complementarity determining regions“, CDR). Die dritte dieser CDRs entsteht im Rahmen der physiologischen somatischen Rekombination durch die klonenspezifische Verknüpfung von V_H-, D_H- und J_H-Segmenten, die dabei nach dem Zufallsprinzip erfolgt („recombinatorial diversity“). Die Umlagerung erfolgt unter der Kontrolle eines sog. Rekombinase-Komplexes. Dabei wird die Nukleotidsequenz zum einen durch die Exzision unterschiedlich großer Segmente aus den flankierenden Bereichen der beteiligten Segmente durch Exonukleasen („exonucleolytic nibbling“) und Addition homologer Nukleotide, zum anderen durch die Insertion nicht keimbahnkodierter N („non-template“)-Nukleotide durch das Enzym Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an den Verknüpfungen zwischen den V_H-, D_H- und J_H-Segmenten modifiziert („junctional diversity“). Anschließend erfolgt die Zusammenfügung eines D_H- mit einem J_H-Segment bzw. eines V_H-Segmentes mit der D_H-J_H-Region. Diese beiden Vorgänge erfolgen ebenfalls nach dem Zufallsprinzip. Das nun funktionelle Schwerekettengen wird mit einem konstanten C_H-Segment verknüpft und anschließend in ein primäres RNA-Transkript umgeschrieben. Voraussetzung für die Translation der RNA und nachfolgende Produktion eines funktionsfähigen Proteins ist das Vorhandensein eines funktionellen Leserahmens.

Ein Antigenrezeptorrearrangement kann prinzipiell auf beiden Allelen des Immunglobulinrezeptors erfolgen. Sofern bereits über das erste Allel ein produktives V_HD_HJ_H-Rearrangement generiert wurde, wird die Produktion eines zweiten Antigenrezeptors auf dem zweiten Allel verhindert („allelic exclusion“). Nach der Feststellung der Eignung der Schwerekettengene wird nun die kappa- oder lambda- Leichtkette nach den gleichen Mechanismen synthetisiert.

Das V_H - D_H - J_H -Rearrangement erfolgt vor einem Antigenkontakt in den lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Nach erfolgter Migration in die Keimzentren der Lymphfollikel können die Immungenrearrangements durch zwei andere Mechanismen weiter modifiziert werden, durch somatische Hypermutationen und den Isotyp- bzw. Klassenwechsel („isotype-switching“ bzw. „class switch recombination“).

Somatische Hypermutationen erfolgen sowohl in Schwer- und Leichtkettengenrearrangements bei proliferierenden B-Zellen im Rahmen der Auseinandersetzung mit einem Antigen im Keimzentrum mit dem Ziel, eine noch höhere Affinität für das entsprechende Antigen zu erreichen („affinity maturation“, „receptor editing“) und bedingen somit eine physiologisch notwendige genomische Instabilität im Keimzentrum. Mit sehr hoher Rate erfolgen dabei vornehmlich Punktmutationen in den variablen Domänen, seltener auch Insertionen und Deletionen (Jacob et al. 1991, Berek et al. 1991, Papavasiliou et al. 1997, Storb 1998). Dieser Veränderungen lassen sich hauptsächlich in der IgH-CDR3-Region nachweisen und dort besonders im Bereich der FR3 (Jolly et al. 1996). Die Möglichkeit der somatischen Hypermutation bleibt im Rahmen der Lymphomgenese erhalten (Aarts et al. 2001).

Am Ende dieser Prozesse entsteht eine relativ kleine, 80 bis 150 bp lange, hypervariable IgH-CDR3-Region, die aufgrund ihrer hohen Sequenzvariabilität einen genetischen Fingerabdruck für jeden proliferierenden B-Zell-Klon darstellt. Aufgrund des gleichzeitigen Vorhandenseins hochkonservierter, sequenzhomologer Bereiche innerhalb der flankierenden V_H - und J_H -Segmente und einer kleinen, hypervariablen Region an der Verknüpfung zwischen den einzelnen Gensegmenten stellt die CDR3-Region einen idealen Ansatzpunkt für die Amplifikation mittels der PCR dar. Das dabei entstehende Produkt ist klon- und damit patientenspezifisch und kann als molekularer Marker zur Charakterisierung von Lymphomen und zur Detektion von minimaler Resterkrankung genutzt werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurden PCR-Assays zum routinefähigen und vereinfachten Nachweis monoklonaler Immungen-Rearrangements etabliert (Linke et al. 1995a und b, Pyttlich 1996, Linke et al. 1997a und b). Der Einsatz von Konsensus-Primern, die an konservierte Sequenzen der V_H - und J_H -Segmente binden, ermöglicht in wenigen Reaktionsansätzen den Nachweis der überwiegenden Mehrzahl aller an einem Rearrangement beteiligten V_H - und J_H -Segmente. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten PCR-

Primern, die in die PCR-Produkte eingebaut werden, lassen sich die auf diese Weise fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät mit Hilfe einer speziellen Software weiter analysieren. Diese sogenannte Genescan-Fragmentanalyse ermöglicht neben der Differenzierung zwischen monoklonalen und polyklonalen PCR-Produkten eine schnelle und präzise Größenbestimmung der einzelnen Fragmente sowie ihre Quantifizierung durch Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität. Monoklonale PCR-Produkte können anschließend direkt in eine automatische Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Mit Hilfe dieses hochgradig automatisierten Verfahrens wurde eine große Anzahl von B- und T-Zell-Lymphomen und –Leukämien untersucht (Kneba et al. 1995, Linke et al. 1995a, Rothaupt 1995, Pyttlich 1996, Linke et al. 1997a und b). Durch den Einsatz einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität gelang in unserer Arbeitsgruppe der Nachweis eines monoklonalen IgH-CDR3-PCR-Produktes in 100% der Fälle von B-Linien ALL und CLL und in 92% der Fälle mit B-NHL (Linke et al. 1995a). Weiterhin konnte die Effektivität der Genescan-Fragmentanalyse zum Nachweis von MRD bei Patienten mit Lymphomen und Leukämien aufgezeigt werden. Bei Einsatz sogenannter klonenspezifischer PCR-Primer kann mit Hilfe dieser Methode eine Lymphom- oder Leukämiezelle vor einem Hintergrund von 10^4 bis 10^5 normalen Zellen detektiert werden (Linke 1997b).

1.2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte das auf der PCR beruhende Verfahren zum Nachweis klonal rearrangierter Immunglobulin-Schwerkettengene für den klinischen Einsatz weiterentwickelt werden. Es galt zum einen, eine möglichst große Anzahl aggressiver B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome mit Hilfe der IgH-CDR3-PCR, der Genescan-Fragmentanalyse und der DNA-Sequenzierung molekulargenetisch zu charakterisieren und zum anderen, in einer prospektiven Untersuchung anhand eines ausgewählten Patientenkollektivs die klinische Einsatztauglichkeit der klonalen molekulargenetischen Marker zum Zwecke der Ausbreitungsdiagnostik und des Nachweises minimaler residueller Lymphomzellen im Therapieverlauf zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurde Material aus peripherem Blut (PB), Knochenmark (KM), Lymphknotengewebe, malignen Ergüssen (Pleura) und Liquor untersucht, das von Patienten stammte, die zur Diagnostik und Therapie in das Zentrum Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, der Universität Göttingen überwiesen worden waren. Aus dem zur histologischen Diagnostik nicht benötigten Untersuchungsmaterial wurde genomische DNA für die molekulargenetische Analyse extrahiert. Von Herrn Prof. Dr. L. Trümper (damals Medizinische Klinik 1, Universität des Saarlandes) wurden im Rahmen eines Ringversuches der Arbeitsgruppen aus Göttingen, Homburg und Ulm 6 hochmolekulare DNA-Extrakte von Patienten mit einem aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht mit den entsprechenden Diagnosen findet sich in Tabelle 15 (Anhang).

Als Negativkontrolle für die Konsensus-PCR und die semiquantitativen PCRs diente DNA, die aus mononukleären Zellen aus dem Vollblut mehrerer gesunder Spender gewonnen wurde. Als Positivkontrollen für die Konsensus-PCR wurden DNA-Extrakte mit einem bekannten Genrearrangement eingesetzt, die entweder aus einer Tumorzelllinie oder aus Patientenmaterial gewonnen worden waren.

2.2 Materialaufbereitung

2.2.1 Kernpräparation

Für die Kernextraktion wurden 10 ml der Probe mit 30 ml 0,3% Triton gemischt, auf Eis inkubiert und anschließend 10 min mit 1500 g und bei 4°C abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Kernpellet in 10 ml J.G.-Puffer resuspendiert, mit 20 ml 0,3% Triton aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Danach konnte das Kernpellet entweder direkt der DNA-Extraktion zugeführt oder bei -20°C asserviert werden.

2.2.2 DNA-Extraktion

Bei einem ausreichenden Probenvolumen erfolgte die DNA-Extraktion mit einem automatischen DNA-Extraktor (Genepure 341 DNA-Extraktor, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Vorschrift des Herstellers durch Lyse der Zellen, Proteinase K-Verdau, Phenolextraktion und Ethanol-fällung.

War das Probenvolumen für eine automatische DNA-Extraktion ungeeignet, wurde das Kernpellet in 600 µl J.G.-Puffer, 24 µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 36 µl 10% SDS und einer Spatelspitze Proteinase K aufgenommen und für 2 Stunden bei 60°C in einem Heizblock oder über Nacht auf einem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl eines Phenol/Chloroform/Wasser-Gemisches (68:18:14) hinzugegeben und 5 min bei 13000g zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 400 µl Chloroform wurde dieses Gemisch erneut für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Dem wässrigen Überstand wurden zur DNA-Fällung 60 µl 3M Natriumacetat und 1200 µl 100% Ethanol hinzugegeben und bei 13000g 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 300 µl 70% Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1 x TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde mit einem UV-Spektralphotometer bei 260/280 nm bestimmt (OD 1,0 entspricht 50 µg/ml DNA).

2.2.3 DNA-Gewinnung aus Paraffinschnitten

In der Regel 3 Paraffinschnitte der Dicke 7µm wurden in einem Eppendorf-Hütchen zweimal mit 1 ml Xylol, einmal mit 1ml 100% Ethanol sowie mit 1 ml 90% Ethanol gewaschen und dabei jeweils 10 min bei 14000g zentrifugiert und dekantiert. Das Präzipitat wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 100 µl PCR-Puffer für 10 min gekocht und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min abgekühlt. Im UV-Spektralphotometer wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Die so gewonnene DNA wurde direkt in die PCR eingesetzt.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.1 IgH-CDR3-Konsensus-PCR

Am Ende des physiologischen IgH-Genrearrangements entsteht eine $V_H-N_1-D_H-N_2-J_H$ -Verknüpfung mit einer relativ kleinen, hypervariablen Nukleotidsequenz. Das Vorhandensein hochkonservierter, sequenzhomologer Bereiche innerhalb der flankierenden V_H - und J_H -Segmente ermöglicht die Konstruktion sogenannter Konsensus-Oligonukleotide. Mit jeweils einem V_H - und einem J_H -PCR-Primer können die 51 funktionellen V_H -Familien und die 6 funktionellen J_H -Familien in einem PCR-Ansatz in 60 bis 95% der Fälle von B-Zell-Neoplasien erfasst werden (Linke 1995a, Linke 1997a).

Alle verwendeten V_H -Primer wurden für die Genescan-Fragmentanalyse mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert und an dem 5'-Ende mit Restriktionsendonukleasen

versehen, die eine einfache Klonierung der PCR-Produkte ermöglichen. Die Primersequenzen und ihre Herkunft (Literatur) werden in Tabelle 1 dargestellt.

| IgH-CDR3-PCR | | |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------|
| V _H | CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT G | McCarthy et al. (1990) |
| J _H | AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C | McCarthy et al. (1990) |

Tabelle 1: Sequenzen der IgH-CDR3-PCR Konsensus-Primer

2.3.1.1 PCR-Bedingungen

Um einen möglichst großen Schutz vor Kontaminationen zu erreichen, wurden die PCR-Ansätze in einem separaten Raum pipettiert (Kwok et al. 1989). Der gesamte Arbeitsgang wurde in einem Eisbad bei 4°C durchgeführt.

Für eine ausreichend spezifische Amplifikation der IgH-CDR3-Rearrangements wurde eine sogenannte „hot-start“-PCT durchgeführt (Chou et al. 1992). Dabei werden die dNTPs und PCR-Primer als Substrate der DNA-Polymerase durch eine Wachsschicht von dem enzymhaltigen Pufferanteil getrennt. Erst durch die hohen Temperaturen in dem Heizblock des Thermocyclers schmilzt das Wachs, was zur Vermischung der Reaktionskomponenten führt. Infolgedessen kommt es zu weniger Primerdimerisierungen und weniger unspezifischen Bindungen. Das Prinzip besteht darin, mindestens eine der kritischen Komponenten solange der Reaktion vorzuenthalten, bis die Temperatur während der Vorinkubation bzw. während des ersten Zyklus über die Schmelztemperatur der Reaktanten angestiegen ist.

Durch den Einsatz der UITma-DNA-Polymerase mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität („proofreading activity“), die fehlgepaarte Nukleotide am 3'-Ende der Primer entfernt, wird die Spezifität der Primerhybridisierung und damit die Amplifikationseffizienz weiter gesteigert (Linke 1995b).

Ein PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 30 μ l setzt sich folgendermaßen zusammen:

untere Pufferschicht: 15 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,8
 10 mM KCl
 0,002% Glycerin
 3 mM MgCl₂
 je 40 μ M dNTP
 je 5 pmol Primer

obere Pufferschicht: 15 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,8
 10 mM KCl
 0,002% Glycerin
 1 U UITma-Polymerase

Die Bedingungen für die PCR über 35 Zyklen mit einer Verlängerung des ersten und letzten Schritts um 6 bzw. 9 Minuten:

| | |
|---------------------|--------------|
| Denaturierung | 96°C, 1 min |
| Annealing/Extension | 55°C, 45 sec |

2.3.2 β -Actin-PCR

Um falsch-negative PCR-Ergebnisse, beispielsweise durch Degradierung der DNA, erkennen zu können, wurden DNA-Extrakte, die in der IgH-CDR3-PCR kein PCR-Produkt ergeben hatten, in einer β -Actin-PCR, eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Proben amplifizierbare DNA enthielten. Die PCR-Primer wurden von Horkoshi et al. (1992) übernommen.

| Bezeichnung | Primersequenz 5'-3' |
|-------------|---------------------------------|
| BA 67 | GCG GGA AAT CGT GCC TGA CAT T |
| BA 68 | GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG |

Tabelle 2: Sequenzen der Primer für die β -Actin-PCR

Der PCR-Ansatz bestand aus 50 µl Puffer mit jeweils 200 ng Primer, durchschnittlich 500 ng DNA, 3 mM MgCl₂ und 1 U Taq –Polymerase. Er wurde aus dem Eisbad bei 80-95°C in den Thermocycler PTC-100 gestellt. Die PCR erfolgte über 40 Zyklen mit einer Verlängerung des ersten Schrittes um 7 min und des letzten Schrittes um 10 min zu folgenden Bedingungen:

| | |
|---------------|--------------|
| Denaturierung | 96°C, 1 min |
| Annealing | 62°C, 1 min |
| Extension | 73°C, 30 sec |

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Gel loading buffer gemischt und in 3%-igen Agarosegelen, die mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt waren, aufgetrennt (Sambrook et al., 1989). Als Laufpuffer diente dabei 1 x TBE, die angelegte Spannung betrug 120 V. Zur Größenbestimmung wurden Mol Weight PCR Marker oder USB Marker als Größenstandard aufgetragen.

2.4 Fragmentanalyse

2.4.1 PCR-Fragmentanalyse mittels Genescanning

2.4.1.1 Prinzip

Dieses Verfahren beruht auf dem Einsatz Fluoreszenzfarbstoff-markierter Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation spezifischer PCR-Produkte unterschiedlicher Größe und Konzentration in einem hochauflösenden Polyacrylamid (PAA)-Gel auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät (373A DNA Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt). Die über die fluoreszenzmarkierter Primer in die PCR-Produkte inkorporierte Farbstoffe werden mit einem Argonlaser-Photomultiplier-System nach elektrophoretischer Auftrennung detektiert und die PCR-Produkte anhand der dabei gemessenen Fluoreszenzintensität (RFU) quantifiziert. Es lassen sich dabei bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig detektieren.

Die Analyse von Fluoreszenzfarbstoff-markierten PCR-Produkten unterschiedlicher Größe und Konzentration in einem hochauflösenden Polyacrylamid (PAA)-Gel auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät (373A DNA Sequencer, Applied Biosystems,

Weiterstadt) ermöglicht nicht nur ihre exakte Größenbestimmung, sondern auch ihre Quantifizierung durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität. Unter Verwendung markierter Oligonukleotid-Primer lassen sich PCR-Produkte amplifizieren, deren inkorporierte Fluoreszenzfarbstoffe über ein Argonlaser-Photomultiplier-System zunächst angeregt und nach elektrophoretischer Auftrennung detektiert werden können. Dabei lassen sich bis zu vier verschiedene Farbstoffe gleichzeitig detektieren. Um die Länge der PCR-Produkte unabhängig von Variationen des Laufverhaltens zwischen den einzelnen Spuren im Gel bestimmen zu können, wird gleichzeitig in jeder Spur ein interner Längenstandard mitaufgetragen, der sich durch die Markierung mit einem roten Farbstoff (6-Carboxyrhodamin) farblich von den zu analysierenden Fragmenten, versehen mit einem blauen Farbstoff (6-Carboxyfluorescein), unterscheidet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Genescan 672, Version 1.2, Applied Biosystems, Weiterstadt, auf einem Apple Macintosh Centris 650 Rechner.

Jedem PCR-Fragment einer bestimmten Größe, gemessen in Basenpaaren (bp), wird ein Signal („Peak“) in der graphischen Darstellung zugeordnet, wobei die relative Fluoreszenzintensität (RFU) auf der Ordinate als Funktion der Größe der PCR-Produkte in Basenpaaren auf der Abszisse dargestellt ist. Die Fläche unter der Kurve ist dabei als relative Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des eingesetzten PCR-Produktes. Während ein distinkter, schlanker „Peak“ einem monoklonalen Rearrangement entspricht, stellen sich polyklonale PCR-Produkte aufgrund ihrer Grössenheterogenität als ein Spektrum von Banden unterschiedlicher Größe dar, deren relative Intensitäten annähernd einer Gauß'schen Verteilung entsprechen. Ein Abstand von 3 Basenpaaren zwischen den einzelnen „Peaks“ entspricht 1 Codon und deutet auf ein funktionelles Rearrangement mit einem offenen Leserahmen hin (Pollard et al. 1993, Shiach et al. 1993).

2.4.1.2 Klonalitätsanalyse von IgH-CDR3-PCR-Produkten durch die Genescan-Fragmentanalyse

Für die Klonalitätsanalyse Fluoreszenzfarbstoff-markierter PCR-Produkte wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich die Genbereiche in den junktionalen Regionen zwischen den rearrangierten $V_H-N_1-D_H-N_1-J_H$ -Segmenten in ihrer Länge unterscheiden. Diese Längenvariabilität beruht zum einen auf der Exzision unterschiedlich großer Abschnitte aus den flankierenden Bereichen der beteiligten V_H - und J_H -Segmente durch Exonukleasen

(„exonucleolytic nibbling“) und unterschiedlich großer Deletionen in den bruchpunktnahen Bereichen der rearrangierten Gensegmente (sog. „trimming“), zum anderen auf der willkürlichen Insertion nicht keimbahnkodierter N-Nukleotide an den Bruchpunkten.

Bei einem IgH-CDR3-PCR-Produkt, das durch die Amplifikation unterschiedlich großer V_H - N_1 - D_H - N_1 - J_H -Regionen generiert wird, zeigt das Genescan-Analyseprogramm ein Kurvenmuster, das in Länge und Konzentration den in dem PCR-Produkt enthaltenen Fragmenten entspricht. Ein monoklonales PCR-Produkt zeigt sich als isolierter „peak“ in dem für die IgH-CDR3-Region erwarteten Größenbereich.

2.4.1.3 Durchführung

2.4.1.3.1 Gelherstellung und Elektrophoresebedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung der Farbstoff-markierten PCR-Produkte erfolgte auf einem vertikalen 6%-igen Polyacrylamid (PAA)-Gel, das 8,3% Harnstoff enthielt. Zur Herstellung des Gels wurden 30 g Harnstoff mit 6 ml 10 x TBE, 9 ml Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1) und 23,5 ml aqua bidest versetzt. Nach Filtration durch einen Einmalsterilfilter (2 μ m) wurde das Gel luftblasenfrei zwischen zwei 30 x 25,5 cm großen, planen Glasplatten (Laufstrecke 24 cm) mit einer Dicke von 0,4 mm gegossen. 300 μ l 6%-iges Ammoniumpersulfat und 24 μ l TEMED dienten zum Polymerisieren. Die PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen auf das PAA-Gel mit dem gleichen Volumen einer Formamid:EDTA (5:1)-Lösung und 0,5 μ l Genescan ROX 350 Längenstandard gemischt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 800 V, 18-19 mA und 15 W mit 1 x TBE als Laufpuffer über einen Zeitraum von 6 bis 8 Stunden. Auf diese Weise ist die gleichzeitige Analyse von bis zu 36 verschiedenen Proben möglich.

2.4.2 Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) von IgH-CDR3-PCR-Produkten

2.4.2.1 Prinzip

Aufgrund der sehr guten Trenneigenschaften von Polyacrylamid-Gelen lässt sich die Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) analytisch zur Identifikation klonal rearrangierter Immungene und präparativ für die Sequenzbestimmung nutzen.

Die TGGE macht sich zunutze, dass das Laufverhalten doppelsträngiger DNA- bzw. doppelsträngiger PCR-Produkte während der Elektrophorese in einem denaturierenden PAA-Gel über einen kontinuierlichen Temperaturgradienten, der parallel das elektrische Feld überlagert, abhängig ist von ihrer Größe, Konformation, Ladung und thermischen Stabilität (Riesner et al. 1989). Drei Prinzipien kommen dabei zum Tragen:

- 1) die Denaturierung von Biomolekülen bei steigender Temperatur
- 2) die Änderung der Denaturierungstemperatur von Doppelstrang-DNA durch Sequenzunterschiede
- 3) die Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamid-Gel durch Konformationsunterschiede.

2.4.2.2 TGGE zur Klonalitätsanalyse von IgH-CDR3-PCR-Produkten

Die Größe der PCR-Produkte, die bei der IgH-CDR3-PCR amplifiziert werden, variiert lediglich in einem kleinen, umschriebenen Bereich (Spannbreite bis 50 bp). Eine Auftrennung nach der Größe erlaubt nur eine ungenaue Diskriminierung zwischen mono- und polyklonalen Anteilen eines PCR-Produktes. Bei der TGGE dient neben der Fragmentlänge auch die spezifische Nukleotidsequenz der IgH-CDR3-Region als Marker für die individuell rearrangierten Genabschnitte.

Durch die Denaturierung der doppelsträngigen PCR-Produkte und ihre anschließende Renaturierung bei einer unspezifischen Temperatur entstehen sogenannte Homoduplices mit komplementären DNA-Partnersträngen und Heteroduplices. Die Homoduplex-Strukturen haben aufgrund ihrer stärkeren Bindungskräfte eine höhere Schmelztemperatur als die Heteroduplices, deren thermische Stabilität deutlich reduziert ist. Es kommt innerhalb der PCR-Fragmente zur Ausbildung von Regionen, in denen die DNA partiell aufgeschmolzen ist und durch die die Wanderungsgeschwindigkeit der zugehörigen Fragmente in dem Gel erheblich reduziert wird. Das Verhältnis, in dem die beiden Strukturen zueinander entstehen, ist abhängig von der Zusammensetzung des zu analysierenden PCR-Produktes. Ein polyklonales PCR-Produkt bildet bei der Renaturierung fast nur Heteroduplices, während Homoduplices in entsprechender Menge nur bei monoklonalen PCR-Produkten entstehen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden monoklonale PCR-Produkte mit einem identischen Schmelzverhalten nach einer Silberfärbung als scharf umrissene Bande dargestellt, während aus polyklonalen PCR-Produkten, die fast über den gesamten

Temperaturbereich schmelzen, eine Vielzahl von Banden geringer Intensität in unterschiedlichen Positionen im Gel entstehen, die als diffuser Hintergrund entlang der Laufstrecke erscheinen.

Aufgrund der sehr guten Trenneigenschaften von PAA-Gelen lässt sich die TGGE nicht nur analytisch zur Identifikation von monoklonalen IgH-CDR3-PCR-Produkten nutzen, sondern auch präparativ, nach ihrer Elution und Reamplifikation, für die anschließende Sequenzbestimmung. Die eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten störenden polyklonalen Amplifikate werden dabei aufgrund ihrer unterschiedlichen Thermostabilität und ihres folglich anderen Schmelzverhaltens durch die TGGE von den monoklonalen Fragmenten abgetrennt. Letztere werden nach einer Silberfärbung aus dem TGGE-Gel ausgeschnitten und daraus die DNA extrahiert. Zur Reamplifikation der eluierten PCR-Produkte wird der bekannte V_H-Consensus-Primer eingesetzt, der am 5'-Ende mit einer USP-Sequenz versehen ist. Die anschließend durchgeführte Cycle Sequencing Reaktion erfolgt mit dem Universal Sequencing Primer als V_H-Primer.

2.4.2.3 Durchführung

2.4.2.3.1 Gelherstellung

Eine Gellösung, bestehend aus 8% Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid 19:1), 8 M Harnstoff, 2% Glycerol und 1 x MOPS in einem Volumen von 45 ml aqua bidest, wurde nach Zugabe von 250 µl APS und 75 ml TEMED auf einer 213 x 210 mm großen Trägerfolie zum Polymerisieren gebracht.

2.4.2.3.2 De- und Renaturierung der PCR-Produkte

Zur deutlicheren Trennung von mono- und polyklonalen PCR-Produkten wurden diese direkt vor dem Auftragen einem De- und Renaturierungsschritt unter nicht-stringenten Bedingungen unterzogen, um auf diese Weise den Anteil an Heteroduplices in dem PCR-Produkt-Gemisch zu vergrößern. Hierzu wurden 9 µl des zu analysierenden PCR-Produkts mit 1 µl Gel loading buffer gemischt und für 10 min in einem PTC-100 Thermocycler bei 95°C denaturiert und anschließend für 10 min bei 55°C renaturiert.

2.4.2.3.3 Elektrophoresebedingungen

Zur gleichmäßigen Wärmeübertragung wurde 0,1% Triton auf die kunststoffbeschichtete Aluminiumplatte der TGGE-Kammer gegeben, bevor die Trägerfolie mit dem Polyacrylamid aufgetragen wurde. Der kontinuierliche Temperaturgradient von 20°C bis 60°C (durch zwei Thermostatwasserbäder) wurde durch einen Gelvorlauf bei 300 V in 1 x MOPS-Laufpuffer für 20 min aufgebaut. Nach dem Auftragen der PCR-Produkte sowie eines Längenstandards mit einem Gesamtvolumen von jeweils 7 µl pro Auftragsstelle erfolgte die Elektrophorese über 3 Stunden bei 300 V.

2.4.2.3.4 Silberfärbung

Während des gesamten Färbungs- und Entwicklungsvorgangs wurde das Gel ständig auf einem Schüttler bewegt.

Für die Färbung wurden nacheinander folgende Lösungen verwandt:

| | | |
|-------------|--|-----------|
| Fixierung | 10% Ethanol, 0,5% CH ₃ COOH | 2 x 3 min |
| Färbung | 0,1% AgNO ₃ | 10 min |
| Entwicklung | 0,15% CH ₂ O, 1,5% NaOH | 20 min |

Die Entwicklung wurde bei einer ausreichenden Färbung nach 10 min mit 0,75% Na₂CO₃ abgebrochen und das Gel mit Wasser gespült. Zur Aufbewahrung wurde es anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt.

2.4.2.3.5 Elution und Reamplifikation von PCR-Produkten aus dem TGGE-Gel

Die als distinkte Bande der entsprechenden Größe dargestellten monoklonalen PCR-Produkte wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herauspräpariert und in ein steriles Eppendorfhütchen mit 100 ml aqua bidest. überführt. Im Heizblock wurde die DNA für 30 min bei 37°C aus dem Gel eluiert. Zur anschließenden Reamplifikation wurden die ursprünglichen Primer, die mit einer Universal Sequencing Primer (USP)-Sequenz versehen wurden, eingesetzt.

| Primer | Nukleotidsequenz 5' – 3' |
|--------|---|
| USP-VH | GTA AAA CGA CGG CCA GTC TGT CGA CAC GGC CGT GTA TTA CTG |
| T7-VH | CTG GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CCT GTC GAC ACG GCC GTG TAT TAC TG |
| RSP-JH | CAG GAA ACA GCT ATG ACA ACT GCA GAG GAG ACG GTG ACC |

Tabelle 3: Sequenzen der Reamplifikations-Primer zur Vorbereitung der direkten Sequenzierung

Die Größe der PCR-Produkte wurde anschließend in einem Agarose-Gel überprüft (s.o.). Nach Aufreinigung mit dem Centricon 100 Microconcentrator wurden die PCR-Produkte in die Cycle Sequencing Reaktion (s.u.) eingesetzt.

2.5 Klonierung

IgH-CDR3-PCR-Produkte, die mit Oligonukleotiden mit Restriktionsendonukleasen am 5'-Ende generiert worden waren, wurden nach einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen in pUC19 Plasmid ligiert und in *E. coli* DH5a kloniert.

2.5.1 Vorbereitung der einzelnen Komponenten

2.5.1.1 Restriktionsverdau von pUC19 Plasmid mit EcoRI, Bam HI und HindIII

Der Ansatz aus 20 µl Plasmid pUC19 DNA, je 2,5 µl Restriktionsenzym, 5 µl Reaktionspuffer 3 (für HindIII Puffer 2) wurde mit aqua bidest. auf 50 µl aufgefüllt und bei 37°C für 2 h inkubiert. Danach wurde der gesamte Ansatz für die Vektorpräparation mit 5 µl Gel loading buffer auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 2%-iges Low Melting Agarose-Gel aufgetragen und mit 70 V über 20 min aufgetrennt. Die dem Plasmid entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und bei 70°C 5 min geschmolzen. Die Aufreinigung wurde mit dem Magic PCR Preps DNA Purification System, Promega, nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Auftrag von 8 µl des Extraktes auf ein 2%-iges Agarose-Gel durch den Vergleich mit verschiedenen Konzentrationen des Mol Weight PCR Markers USB.

2.5.1.2 Kompetente E.coli DH5a

Für die Klonierung wurden kompetente *E. coli* DH5a –Zellen der Firma GIBCO BRL verwendet.

2.5.1.3 Herstellung von LB-Agarplatten mit IPTG, X-gal und Ampicillin

Für jede Platte wurden 30 ml 1,5% LB-Agar (Bacto-Agar in LB-Medium) aufgekocht und anschließend im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Nach Zugabe von 100 µl 10% X-gal in Dimethylformamid (DMF), 0,1 M IPTG und 15 µl Ampicillin (100 mg/ml) wurde die Lösung in sterile Petrischalen gegossen.

2.5.2 Klonierung von IgH-CDR3-PCR-Produkten

2.5.2.1 Restriktionsverdau und Präparation der PCR-Produkte

Der Ansatz für den Restriktionsverdau der PCR-Produkte setzte sich zusammen aus 34 µl PCR-Produkt, je 2,5 µl der benötigten Restriktionsenzyme und je 2,5 µl der entsprechenden Reaktionspuffer. Der Ansatz wurde mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die weitere Präparation erfolgte wie unter 2.5.1.1. für die Vektorpräparation beschrieben.

2.5.2.2 Ligation der PCR-Produkte in pUC19 Plasmid-DNA

Zur Ligation der PCR-Produkte in das Plasmid pUC19 wurde die Ready-To-Go T4 DNA-Ligase verwendet. Das aufgereinigte PCR-Produkt und das mit dem entsprechenden Enzym geschnittene Plasmid pUC19 wurden in einem Massenverhältnis von 4:1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit der Ready-To-Go T4 DNA-Ligase vermischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.5.2.3 Transformation in kompetente E.coli DH5a

2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 80 µl kompetenten *E. coli* DH5a in ein auf Eis gekühltes Falsonröhrchen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, einem Hitzeschock für 45 sec bei 45°C und der erneuten Inkubation auf Eis für 2 min wurden 920 µl SOC Medium hinzugegeben und der Ansatz im Wasserbad schüttelnd für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.5.2.4 Koloniewachstum und Plasmid-Aufreinigung

200 µl des Transformationsansatzes wurden gleichmäßig auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden ca. 10 weiße Kolonien ausgewählt und in ein Falcon-Röhrchen mit 2,5 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin überführt. Der Ansatz wurde über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert, mit dem Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in aqua bidest. aufgenommen.

2.5.2.5 Insertkontrolle

Zur Insertkontrolle wurden 5 µl aufgereinigtes Plasmid mit jeweils 5 µl Restriktionsenzym und je 5 µl Reaktionspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Insertgröße wurde in einem 2%-igen Agarose-Gel anhand eines DNA-Längenstandards überprüft.

2.6 Sequenzierung

In Abhängigkeit von ihrem polyklonalen Hintergrund wurden PCR-Produkte auf verschiedene Weisen der Sequenzier-Reaktion zugeführt.

PCR-Produkte, die in der Genescan-Analyse ein monoklonales Muster aufwiesen, wurden direkt in die Cycle Sequencing Reaktion eingesetzt. Voraussetzung hierfür war, dass der polyklonale Hintergrund im Genescan weniger als 15% betrug, da es sonst zu erheblichen Überlagerungsreaktionen kommen kann.

Einige monoklonale PCR-Amplifikate konnten erst nach elektrophoretischer Auftrennung in einem präparativen TGGE-Gel eluiert, reamplifiziert und anschließend sequenziert werden.

PCR-Produkte mit einem erheblichen polyklonalen Hintergrund wurden in den Vektor pUC19 ligiert, in kompetente *E. coli* DH5a transformiert und anschliessend nach einer Präparation in die Cycle Sequencing Reaktion eingesetzt.

Die Identifikation von zwei oder mehr sequenzidentischen Klonen im PCR-Produkt eines Patienten kennzeichnete das klonale Produkt. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzdaten mit den in der Literatur für die V_H-, D_H- und J_H-Gene publizierten Sequenzen erlaubte die Zuordnung der beteiligten V_H-, D_H- und J_H-Segmente sowie die Bestimmung der nichtkodierten klonspezifischen N-Regionen.

2.6.1 Cycle Sequencing

2.6.1.1 Prinzip

Das Cycle Sequencing beruht auf der Sequenziermethode nach Sanger et al. (1977). Durch die Kombination der Sequenzierreaktion mit einer asymmetrischen PCR ermöglicht das Cycle Sequencing auch bei geringen Mengen an Ausgangs-DNA eine nicht-radioaktive Sequenzanalyse größerer DNA-Fragmente. Dabei werden Farbstoff-markierte ddNTP's in die Sequenzierungs-PCR eingesetzt (Lee et al. 1992). Auf diese Weise können die vier Terminationsreaktionen in einem PCR-Ansatz durchgeführt werden. Tabelle 4 zeigt die verwendeten farbstoffmarkierten ddNTP's (Dye Terminatoren, Applied Biosystems, Weiterstadt)

| Bezeichnung | | Kennfarbe | Farbe im Gel |
|-------------|--------------------------------|--------------|--------------|
| A | (5-carboxyrhodamin 6G) | grün | grün |
| C | (6-carboxyrhodamin X) | blau | rot |
| G | (5-carboxyrhodamin 110) | gelb/schwarz | blau |
| T | (6-carboxytetramethylrhodamin) | rot | gelb |

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoff-markierte ddNTP's der Cycle Sequencing Reaktion

Als Elektrophoresesystem und zur Detektion diente ein automatisches DNA-Sequenziersystem (373A Sequencer, Version 2.10, Applied Biosystems, Weiterstadt). Dieses System benutzt zur Anregung fluoreszierender Farbstoffe einen Argonlaser mit den Hauptemissionen bei Wellenlängen von 514 nm und 488 nm. Die Auswertung erfolgte über das 373A DNA Sequencer Data Collection Programm, Version 1.2.1., das 373A DNA-Sequencer Data Analysis Programm, Version 1.2.1. und das SeqEd 675 Programm (Applied Biosystems, Weiterstadt) auf einem Apple Macintosh Centris 650 Computer.

2.6.1.2 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Cycle Sequencing-Reaktion

Vor der Sequenzierungsreaktion wurden die PCR-Produkte für die direkte Sequenzierung und PCR-Produkte nach TGGE-Reamplifikation über Centrion 100 Microconcentrator nach dem Herstellerprotokoll von überschüssigen dNTP's, Primern und Primerdimeren gereinigt.

2.6.1.3 Primer für die Cycle Sequencing-Reaktion

Die Reamplifikation von IgH-CDR3-PCR-Produkten nach der TGGE erfolgte mit einem VH-T7- und einem JH-RSP-Primer, so dass für die Sequenzieranalyse die Sequenzierprimer T7 und M13/pUC-RSP eingesetzt werden konnten.

Tabelle 5 zeigt die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

| Bezeichnung | Primersequenz 5' – 3' |
|-------------|-------------------------------------|
| M13/pUC-RSP | d (CAG GAA ACA GCT ATG AC) |
| T7 | d (CGC GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG) |

Tabelle 5: Sequenzen der Primer für die Cycle Sequencing-Reaktion

2.6.1.4 Reaktionsansatz für die Cycle Sequencing-Reaktion

Der mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllte Reaktionsansatz enthielt 10 pmol Primer, 0,5 – 1,0 µg DNA-Template sowie 9,5 µl Premix. Dieser Premix (Applied Biosystems, Weiterstadt) hatte folgende Zusammensetzung:

| | | | |
|-------------------------|--------|------------|------|
| 5x TACS-Puffer | 4 µl | DyeDeoxy A | 1 µl |
| dNTP-Mix | 1 µl | DyeDeoxy T | 1 µl |
| Amplitaq DNA-Polymerase | 0,5 µl | DyeDeoxy G | 1 µl |
| | | DyeDeoxy C | 1 µl |

Die Thermocyclerbedingungen über 25 Zyklen im Biozym-Thermocycler waren für die PCR mit den Primern M13/pUC-RSP und T7 wie folgt festgelegt:

| | | |
|---------------|------------------------------------|--------|
| Denaturierung | 96°C | 15 sec |
| Annealing | 50°C (M13/pUC-RSP)/ 60°C (T7 60°C) | 1 sec |
| Extension | 60°C | 4 min |

2.6.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte nach der Cycle Sequencing-Reaktion

Zu dem 20 µl Reaktionsansatz wurden 80 µl aqua bidest. hinzugegeben, gemischt, mit 100 µl Phenol/Chloroform/Wasser (68:18:14) aufgefüllt und erneut gemischt. Dieser 200 µl Ansatz wurde anschließend für 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein steriles Eppendorf-Hütchen überführt, wiederum mit 100 µl Phenol/Chloroform/Wasser aufgefüllt und zentrifugiert. Nach dieser zweiten Extraktion wurde die wässrige Phase mit 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und 300 µl Ethanol versetzt und für 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Präzipitat mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert, der Ethanolüberstand wurde entfernt und das DNA-Pellet 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.6.1.6 Elektrophorese der Sequenzierungsreaktionsprodukte

Das aufgereinigte DNA-Pellet wurde je nach Größe der Auftragsslots in 3 µl oder 4 µl Formamid : 50 mM EDTA, pH 8,0 (5:1) gelöst, für 2 min bei 95°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Der Auftrag auf ein 6%-iges Polyacrylamid-Gel mit 8,3 M Harnstoff erfolgte am 373A DNA Sequencer, Version 2.10 mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte über 12 h mit 1600 V, 20 mA und 30 W.

2.7 Patientenspezifische PCR (N-PCR)

2.7.1 Prinzip

Die Identifikation der junktionalen Sequenz eines spezifischen IgH-CDR3-Rearrangements bildet die Grundlage für die Synthese allelspezifischer Oligonukleotide (N-Primer). Der Einsatz einer solchen klon- und damit patientenspezifischen PCR ermöglicht es, in Verlaufsmaterialien eines Patienten gezielt nach residuellen Tumorzellen zu suchen und damit eine Aussage über die Effektivität einer Therapie oder die Qualität einer erreichten Remission treffen zu können.

Das Prinzip der N-PCR ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

KLON-SPEZIFISCHE PCR der IgH-CDR3-Region

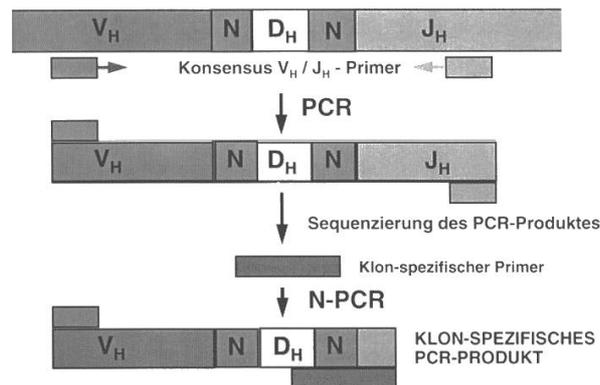


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines IgH-Genrearrangements und der relativen Lage von Konsensus- und klon-spezifischen Primern für die patientenspezifische N-PCR

2.7.2 Konstruktion der allel-spezifischen Oligonukleotide

Ein Vergleich der gewonnenen Sequenzdaten mit bislang bekannten Nukleotidsequenzen von D_H - und J_H -Keimbahngensegmenten (Ravetch et al. 1981, Elgavish et al. 1993, Mattila et al. 1995, Tomlinson et al. 1995) erlaubte die Zuordnung einzelner Gensegmente sowie die Identifikation der klon-spezifischen N-Regionen. Die Identifizierungskriterien für D_H -Segmente wurden von Sanz (1991) übernommen.

Für die Auswahl der N-Primer-Sequenz sollten folgende Überlegungen berücksichtigt werden:

- Die Länge der N-Oligomere sollte idealerweise zwischen 18 und 25 Nukleotiden liegen.
- Je höher der Anteil an Pyrimidinen (G/C) an der N-Primer-Nukleotidsequenz ist, desto stabiler ist die Molekülbindung. Dies ermöglicht eine höhere Annealing-Temperatur, und damit verbessert sich die Spezifität der Primerbindung an die Zielsequenz.
- Eine möglichst vollständige Sequenzhomologie und ein hoher G/C-Anteil sind vor allem am 3'-Ende des N-Primers von Bedeutung, um eine spezifische Bindung zu erreichen.
- Da die Nukleotidsequenz im Bereich der V_H - N_1 - D_H -Region von Veränderungen im Sinne eines „ongoing rearrangements“ (z.B. somatische Hypermutationen) betroffen sein kann, sollte ein N-Oligonukleotid optimalerweise im Bereich der weitaus stabileren D_H - N_2 - J_H -Region die spezifischen Bruchpunkte umspannen, ohne

gleichzeitig zu große Anteile der D_H- und J_H-Segmente zu enthalten. Da es sich hierbei um einen relativ kurzen Sequenzabschnitt handelt, gibt es bisweilen nur wenig Variationsmöglichkeiten in der Position der allel-spezifischen Oligonukleotide.

- Die Oligonukleotide sollten entweder komplett oder an ihrem für die N-spezifische PCR entscheidenden 3'-Ende invers komplementär zur Sequenz dieser N-Region um so den J_H-Konsensus-Primer aus der IgH-Konsensus-PCR ersetzen zu können.
- Abschliessend sollte eine Analyse der ausgewählten Sequenzen mit Hilfe einer speziellen Software erfolgen, um mögliche Dimerbildungen oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen zwischen den Oligonukleotiden zu erfassen.

2.7.3 Bedingungen für die N-PCR

Die PCR-Bedingungen müssen für jeden klonspezifischen Primer zusammen mit dem V_H-Konsensus-Primer individuell festgelegt werden. Die N-PCR wurde dabei als semi-nested-PCR durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die IgH-CDR3-Konsensus-PCR mit 25 Zyklen wiederholt. Von diesem Amplifikat wurde eine 1:100 Verdünnung in aqua bidest. erstellt und davon 2 µl in die anschließende eigentliche N-PCR eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 1 U AmpliTaq Polymerase, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, je 0,2 mM dNTP und je 20 pmol des N- und des V_H-Primers. Die Pipettierschritte wurden im Eisbad durchgeführt. Die Ansätze wurden mit 1 Tropfen Öl beschichtet und in die auf 85- 90°C vorgeheizten Heizblöcke des Thermocyclers TC-480 gesetzt.

Die N-PCR wurde mit 30 Zyklen und um jeweils 2-3°C variierende Annealing-Temperaturen über 1 min durchgeführt, um auf diese Weise die optimale Annealing-Temperatur festzulegen. Die Denaturierungstemperatur betrug 96°C über eine min, die Extensionstemperatur 72°C über 30 sec. Der erste und der letzte Schritt wurden um 6 bzw. 9 min verlängert.

Polyklonale DNA eines gesunden Spenders wurde zur Kontrolle parallel in die Reaktion eingesetzt. Mit der Genescan-Analyse wurden die Fragmentgrößen der N-PCR-Produkte mit dem zuvor errechneten Wert überprüft und die relativen Fluoreszenzintensitäten bei den verschiedenen Annealing-Temperaturen verglichen. In der polyklonalen Kontrolle wurde kein Produkt erwartet, ein polyklonales Hintergrundmuster oder ein in seiner Größe deutlich

abweichendes Fragment konnten jedoch toleriert werden. Mittels Messung der Fluoreszenzintensität konnte überprüft werden, ob eine ausreichende Menge des spezifischen PCR-Produktes amplifiziert worden war. Darüber hinaus ermöglichte sie auch einen semiquantitativen Vergleich zwischen den Versuchsansätzen.

2.7.4 Semiquantitative N-PCR

Das Prinzip der semiquantitativen PCR beruht darauf, dass unter den gleichen Bedingungen verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden DNA-Probe parallel amplifiziert werden und die resultierenden Fluoreszenzsignalintensitäten zueinander in Beziehung gesetzt werden.

2.7.4.1 Erstellen einer Verdünnungsreihe in Wasser

Die Ausgangs-DNA wurde seriell in Zehnerschritten von 10^0 bis 10^6 in Wasser verdünnt. 5 μ l der DNA (Konzentration 100 ng/ μ l) wurden in ein Eppendorf-Hütchen mit 45 μ l aqua bidest. pipettiert und sorgfältig vermischt. Von dieser Verdünnung wurden 5 μ l in das nächste Eppendorf-Hütchen überführt und dieser Vorgang bis zum Erreichen der letzten Verdünnungsstufe wiederholt. Jeweils 5 μ l der einzelnen Verdünnungsansätze wurden in die vorbereiteten Dreifach-PCR-Ansätze eingesetzt. Um dabei eine Kontamination durch weniger verdünnte DNA zu vermeiden, wurde mit der höchsten Verdünnungsstufe begonnen. Im Gegensatz zur Verdünnung in polyklonaler DNA führt der geringere Gesamtgehalt an polyklonaler DNA zu einer präferentiellen Amplifikation des spezifischen Produktes und damit zu einer höheren Sensitivität der N-PCR. Alle Schritte wurden unter einer Laminar Flow Sterilbank durchgeführt.

Nach einer Konsensus-PCR mit 25 Zyklen wurde die N-PCR mit der zuvor ermittelten Annealing-Temperatur durchgeführt. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, wurde in mehreren N-PCR-Läufen der Verdünnungsreihe weiterhin die Zyklenzahl variiert (weniger unspezifische Bindungen, keine Sättigung, Reaktion bleibt im linearen Bereich) und ggf. die Dauer des Extensionsschrittes verkürzt (Vorteil spezifischer Bindungen gegenüber unspezifischen Bindungen). Die Überprüfung der N-PCR erfolgte mit einer anschließenden Genescan-Analyse. Dabei entsprach die Fläche unter dem spezifischen Produkt-„Peak“ der Menge des eingesetzten PCR-Produktes. Die Verdünnungsstufe, bis zu der sich ein spezifischer „Peak“ nachweisen ließ, entsprach der unteren Nachweisgrenze.

2.7.4.2 N-PCR von Patientenmaterialien im Verlauf

Nach der Festlegung der Reaktionsbedingungen für die N-PCRs wurden die verfügbaren Verlaufsmaterialien (peripheres Blut, Knochenmark) der Patienten untersucht. Dabei wurden jeweils 0,5 µg der Verlaufspalten-DNA in Dreifach-PCR-Ansätze eingesetzt. Die Ergebnisse der Verlaufs-PCR wurden mit der Genescan-Analyse überprüft.

Eine graphische Übersicht über den beschriebenen Untersuchungsgang findet sich im nachfolgenden Flußschema (Abbildung 4).

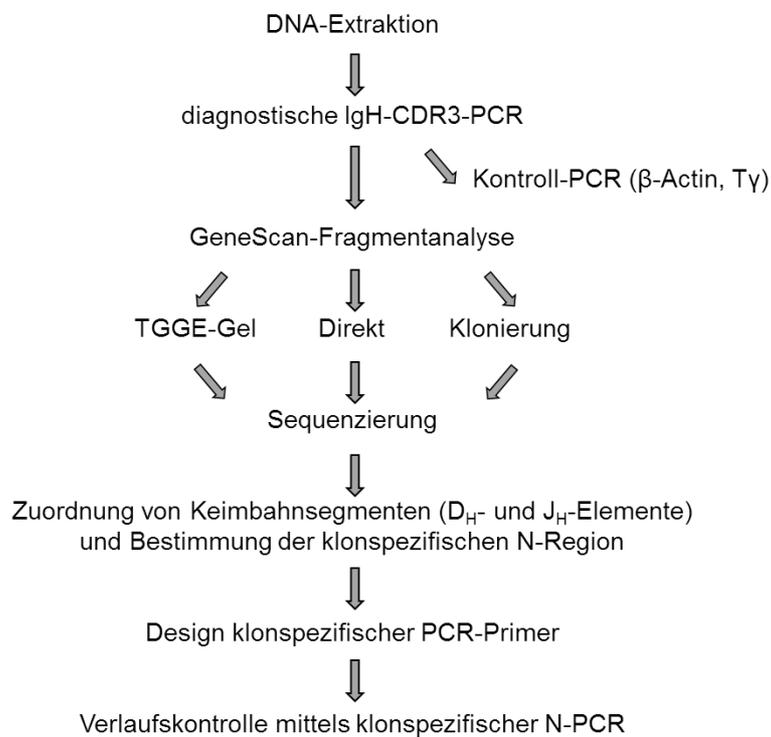


Abbildung 4: Flußschema des Untersuchungsgangs von der molekularen Klonalitätsanalyse bis zur klonspezifischen N-PCR-Analyse

2.8 Puffer, Lösungen, Medien

| | |
|------------------------------|--|
| Agarosegel-Auftragspuffer | 0,2% Bromphenolblau, 15% Ficoll |
| Ethidiumbromid | 15% Ethidiumbromid in aqua bidest. |
| J.G.-Puffer | 50 mM Tris (pH 7,4), 25 mM Sucrose, 5 mM MgCl ₂ , 25 mM KCl |
| Luria Bertani (LB) Medium | 1% Bacto Typone, 0,5% Bact Yeast Extract, 17,1 mM NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt |
| 50x MOPS | 1 M MOPS, 50 mM EDTA (pH 8,0) |
| 10x TE-Puffer | 100 mM Tris, 10 mM EDTA |
| 10x TBE-Puffer | 0,89 M Tris Base, 0,89 M Borsäure, 28 mM EDTA |
| Tfb I-Puffer | 30 mM Kaliumacetat, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ , 15% Glycerol |
| Tfb II-Puffer | 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerol |
| TGGE-Auftragspuffer | 2x MOPS, 8 M Harnstoff, 1/10 Vol. Gel loading buffer |
| Sequenziergel-Auftragspuffer | Formamid / 50 mM EDTA (5:1) (pH 8,0) |

Chemikalien (in der Reihenfolge der Hersteller)

| | |
|------------------------------------|--|
| Applied Biosystems, Weiterstadt | PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Phenol/Chloroform/Wasser (68:18:14) GS ROX 350 |
| Biozym Diagnostik Hameln | Lowmelt DNA Agarose |
| Boehringer Mannheim, Mannheim | DNA Längenstandard V, Sequencing Primer M13/pUC Reverse Sequencing Primer M13/pUC, pUC19 DNA, Ampicillin, X-gal |
| Difco Laboratories, USA | Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract, Bacto Agar |
| Gibco BRL, USA | 10x Reaktionspuffer 3, IPTG, Dimethylformamid, SOC- Medium, EcoRI (10U/μl), BamHI (10U/μl) |
| J.T. Baker B.V., Niederlande | Xylol, Ethanol |
| Merck, Darmstadt | Ammoniaklösung 32%, Harnstoff, NaCl, NaOH, Triton, 40% Glycerin z.A., Essigsäure 100%, Silbernitrat, Temed (N,N,N',N'-Tetramethylenethylen-diamin z.A.), Formaldehydlösung, mind. 37%, Natriumhydroxid Plätzchen, Natriumcarbonat-Monohydrat |
| National Diagnostics, USA | Accugel 40% (19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) |

| | |
|-----------------------------|---|
| Paesel und Lorei, Frankfurt | Agarose HSA |
| Perkin Elmer, USA | AmpliTaq DNA Polymerase, 10x PCR Buffer II, MgCl ₂ , UITma DNA-Polymerase, 10x PCR Buffer, MgCl ₂ , GS-350 Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Oligonukleotide (Auftragssynthese) |
| Pharmacia, Freiburg | Ready-To-Go T4 DNA Ligase |
| Promega, USA | Magic Preps DNA Purification System, Wizard Minipreps DNA Purification System, Phi 174 DNA Hae III Marker |
| Roth, Karlsruhe | Rotiphorese NF Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1) |
| Serva, Heidelberg | 6% APS (Ammoniumpersulfat), Acrylamide 4x, N,N'- Methylenbisacrylamide 2x, Dextran Blau, EDTA, SDS |
| Sigma, USA | Bromphenolblau (3,3',5',5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein (pH 4,6) Ficoll, MOPS (3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid), Ethidiumbromid |

Materialien und Geräte

| | | |
|--|---|-------------------------|
| Automatisches DNA- Sequenziersystem | DNA-Sequencer Modell 373A | ABI, Weiterstadt |
| Centricon 100 | Centricon 100 Microconcentrator | Amicon, USA |
| Elektrophoresekammer | Minigelkammer | Stratagene, Heidelberg |
| Falcon Röhrchen | Falcon tubes 2059, 14 ml | Becton Dickinson, USA |
| Filmentwicklungsgerät | Gevamatic 60 | Agfa-Gevaert, Belgien |
| Gelträgerfolie | Gel-Support-Films | Diagen, Düsseldorf |
| Kamera mit Filmen | MP-4 Land Camera mit 668 Coaterless B&W Instant Pack | Polaroid, USA |
| Festwinkelzentrifuge | Heraeus Sepatech Labofuge A | Heraeus, Osterode/ Harz |
| Flow-Werkbank | Lamin Air LFM 2472 S | Heraeus, Hannover |
| Macintosh.Computer | Centris 650 | Apple Macintosh, USA |
| NAP 10 Säulen | NAP 10 Columns, Sephadex G-25 | Pharmacia Biotech, USA |
| Petrischalen | 94/16 mm Petrischalen | Greiner, Frickenhausen |
| Röntgenfilme | Kodak XAR-5 | Eastman Kodak, USA |

| | | |
|-----------------------|---|--|
| Sequenzierkammer | Sequenzierkammer S2 | BRL, Heidelberg |
| Spannungsgerät | Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 2000/300 | Pharmacia, Freiburg |
| TGGE-Kammer | Diagen-TGGE-System | Diagen, Düsseldorf |
| Thermostatwasserbad | Haake F2 | Haake, Karlsruhe |
| Thermocycler | Thermocycler PE 480 Thermocycler PTC-100 | ABI, Weiterstadt MJ Research Inc., USA |
| UV-Spektralphotometer | Spektrophotometer Genesys 5 | Milton Roy Co., USA |
| UV-Tisch | UV-Illuminator, 254 nm | Bachofer, Reutlingen |
| Vakuumzentrifuge | Vacuum Concentrator | Bachofer, Reutlingen |
| Wasserbad | Haake E15 | Haake, Karlsruhe |
| Zentrifugen | Tischzentrifuge 5415 C Sorvall RT 60000 B | Eppendorf, Hamburg Du Pont, Bad Homburg |

3. ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der IgH-CDR3-Konsensus-PCR in den in unserem Labor zur Verfügung stehenden Materialien von Patienten mit aggressiven B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) klonal rearrangierte Immunglobulingen-Rearrangements nachzuweisen und mittels der Genescan-Fragmentanalyse und der DNA-Sequenzierung molekulargenetisch zu charakterisieren. Weiterhin sollte in einer prospektiven Untersuchung anhand eines ausgewählten Patientenkollektives die klinische Einsatztauglichkeit der klonalen molekulargenetischen Marker zum Zwecke der Ausbreitungsdiagnostik und zum Nachweis von minimaler Resterkrankung (MRD) geprüft werden.

3.1 IgH-CDR3-PCR mit Konsensus-Primern

Zum Nachweis klonal rearrangierter IgH-CDR3-Rearrangements wurden DNA-Extrakte von 49 Patienten mit einem histologisch gesicherten aggressiven B-Zell-NHL untersucht. Die Proben von 6 Patienten wurden freundlicherweise von Herrn Prof. L. Trümper (damals Medizinische Klinik, Universität des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt. Ferner wurden 2 Proben von Patienten mit einem fortgeschrittenen MALT-Lymphom (P26) sowie einem fortgeschrittenen Mantelzell-Lymphom (MCL) (P10) analysiert, die beide eine Hochdosistherapie mit nachfolgender autologer Stammzelltransplantation erhalten hatten.

Bei den aggressiven B-NHL handelte es sich nach der histopathologischen Untersuchung einschließlich einer immunhistochemischen Subtypisierung gemäß der WHO-Klassifikation um 41 Fälle mit einem diffus-großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), um vier lymphoblastische NHL (LBL) und vier Burkitt-NHL. Bei den DLBCL wurde weiterhin morphologisch zwischen 35 zentroblastischen, zwei immunoblastischen und vier anaplastischen Lymphomen differenziert.

Um möglichst viele Patienten untersuchen zu können, wurden sowohl asservierte Materialien retrospektiv als auch neu diagnostizierte Fälle in die Untersuchung eingeschlossen. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich dabei um Primärmaterial bei Erstdiagnose. In 10 Fällen (P02, P03, P07, P11, P17, P19, P20, P34, P41, P44) standen lediglich Proben zum Zeitpunkt eines klinischen Rezidivs zur Verfügung. Bei weiteren vier Patienten (P04, P25, P30, P31) konnte erst nach bereits erfolgtem Therapiebeginn Material gesammelt werden. Dabei war jedoch der Tumorzellgehalt ausreichend, um ein verwertbares PCR-Signal zu erhalten.

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde jede Amplifikation durch mindestens drei getrennte PCR-Ansätze überprüft. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht, auf PCR-Produkte im zu erwartenden Größenbereich hin überprüft und für die nachfolgenden Analyseschritte (Genescan-Fragmentanalyse, Sequenzierung) asserviert.

In Abbildung 5 sind exemplarisch Ergebnisse der Konsensus IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Reaktionen im Agarosegelbild dargestellt.

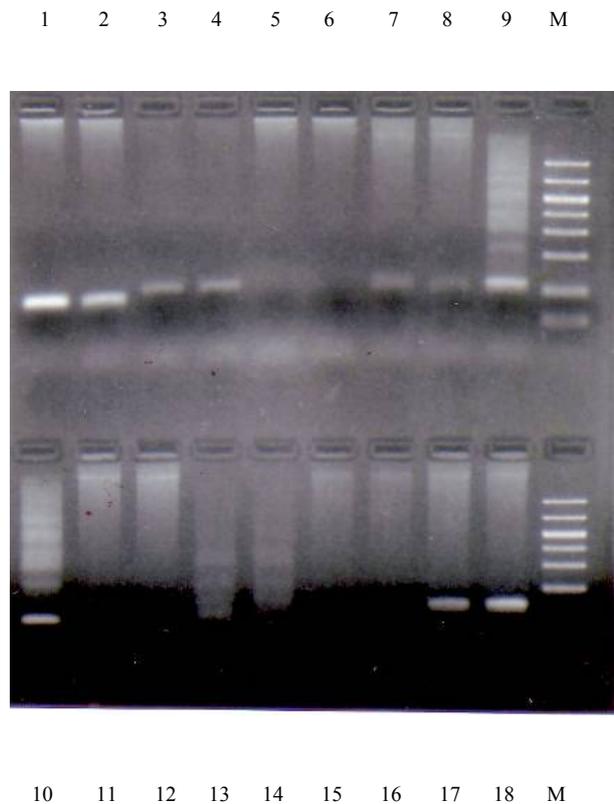


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung einer Agarosegelelektrophorese von IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkten. Auf der rechten äußeren Spur wurde als Längenstandard der PCR-Marker aufgetragen. Folgende Proben wurden in den nachfolgenden Spuren aufgetragen (in Klammern DNA-Nummer):

| | | |
|-----------------|--------------------|-------------------|
| 1+2: P10 (1646) | 9+10: P09 (1612) | 17+18: P25 (1341) |
| 3+4: P20 (1329) | 11+12: P32 (1685) | M: HMW-Marker |
| 5+6: P44 (1365) | 13+14: P14 (1717) | |
| 7+8: P43 (1415) | 15+16: P17a (1543) | |

In 20/49 Fällen (41%) wurde mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR ein monoklonales Amplifikationsprodukt im zu erwartenden Größenbereich nachgewiesen, in 20/49 Proben (41%) wurde ein polyklonales Produkt gewonnen. Ergab die IgH-CDR3-Konsensus-PCR kein Amplifikat, wurde eine β -Actin- und/oder eine TCR γ -PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Proben amplifizierbare DNA enthielten und um damit falsch-negative PCR-Ergebnisse auszuschließen. Von neun Untersuchungsmaterialien ohne amplifizierbares IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkt wurden in 4/9 Fällen (44%) wegen ungenügender DNA-Menge oder DNA-Qualität in der β -Actin- bzw. TCR γ -PCR keine Produkte generiert. Bei den 5/9 (55%) β -Aktin- bzw. TCR γ -PCR-positiven Fällen wurde davon ausgegangen, dass überwiegend intakte und amplifizierbare DNA in den Extrakten vorlag. Nach Abzug der Fälle, von denen keine für die PCR geeignete DNA zur Verfügung stand, konnten somit 45/49 (92%) der Patienten ausgewertet werden, wobei in 20/45 (44%) Fällen ein monoklonales IgH-CDR3-PCR-Produkt sowie in 20/45 (44%) Fällen ein polyklonales IgH-CDR3-PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. (Ergebnisse Tabelle 6 und 7)

| IgH-CDR3-PCR | CDR3 + | CDR3 - | CDR3 -/ β -Actin + | CDR3 -/ β -Actin - |
|-----------------------|--------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| n/n _{gesamt} | 40/49 (82 %) | 9/49 (18 %) | 5/49 (10 %) | 4/49 (8 %) |

Tabelle 6: Ergebnisse der IgH-CDR3-Konsensus-PCR und β -Actin-PCR

| IgH-CDR 3 | IgH-CDR 3 monoklonal | IgH-CDR 3 polyklonal |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| n/n _{gesamt} | 20/45 (44 %) | 20/45 (44 %) |

Tabelle 7: Ergebnisse der IgH-CDR 3-Konsensus-PCR

Legende zu den Tabellen 6 bis 8:

n: Anzahl der untersuchten positiven Fälle oder Fälle mit dem in der jeweiligen Spalte angezeigten Ergebnis

n_{gesamt}: Anzahl aller untersuchten Fälle,

CDR3 +: IgH CDR3-PCR-Produkt erhalten

CDR3 -: kein IgH CDR3-PCR-Produkt erhalten

CDR3-/ β -Actin +: kein CDR-PCR-Produkt, jedoch ein β -Actin-PCR-Produkt erhalten

CDR3-/ β Actin-: kein CDR3- oder β -Actin-PCR-Produkt erhalten

3.2 PCR-Fragmentanalyse mittels Genescanning

Es wurden insgesamt 45 Untersuchungsmaterialien von Patienten mit einem aggressiven B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR amplifiziert und die PCR-Produkte in der Genescan-Fragmentanalyse ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 13 (Anhang) dargestellt.

Neben in der Fragmentanalyse eindeutig monoklonalen oder polyklonalen Mustern fanden sich auch PCR-Produkte, die kein eindeutiges Bild zeigten. Dabei handelte es sich in der Regel um monoklonale Zellpopulationen vor einem polyklonalen Hintergrund (P19, P27, P30). Dies weist auf eine u.U. erhebliche Beimischung normaler Lymphozyten zur Tumorzellfraktion hin. Eine Sequenzierung solcher PCR-Produkte ist mittels zusätzlicher Arbeitsschritte (präparatives TGGE-Gel, Klonierung) prinzipiell möglich, so dass diese Fälle in Tabelle 9 als monoklonale Ergebnisse eingegangen sind.

Nach diesen Kriterien konnte mittels der Genescan-Fragmentanalyse in insgesamt 30/45 Fällen (67%) ein monoklonales Rearrangement nachgewiesen werden (Tabelle 9). Im Vergleich zu den Ergebnissen der IgH-CDR3-Konsensus-PCR ist der Vorteil der Genescan-Fragmentanalyse im Rahmen der Klonalitätsanalyse klar ersichtlich. In 10 Fällen, die nach der Agarosegelelektrophorese als polyklonal gewertet worden waren, konnte mit Hilfe der Fragmentanalyse ein monoklonales Signal detektiert werden. Dadurch konnte die Gesamtdetektionsrate monoklonaler Lymphomzellpopulationen von 44 % auf 67 % gesteigert werden. In 5/45 Fällen konnte mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR kein PCR-Produkt generiert werden, obwohl amplifizierbare DNA vorgelegen hatte.

| Genescan | Genescan monoklonal | Genescan polyklonal |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| n/n _{gesamt} | 30/45 (67 %) | 10/45 (22 %) |

Tabelle 8: Ergebnisse der Klonalitätsanalyse mittels Genescan-Fragmentanalyse (Legende s.o.)

In Abbildung 6 sind nachfolgend einige dieser Fälle exemplarisch dargestellt.

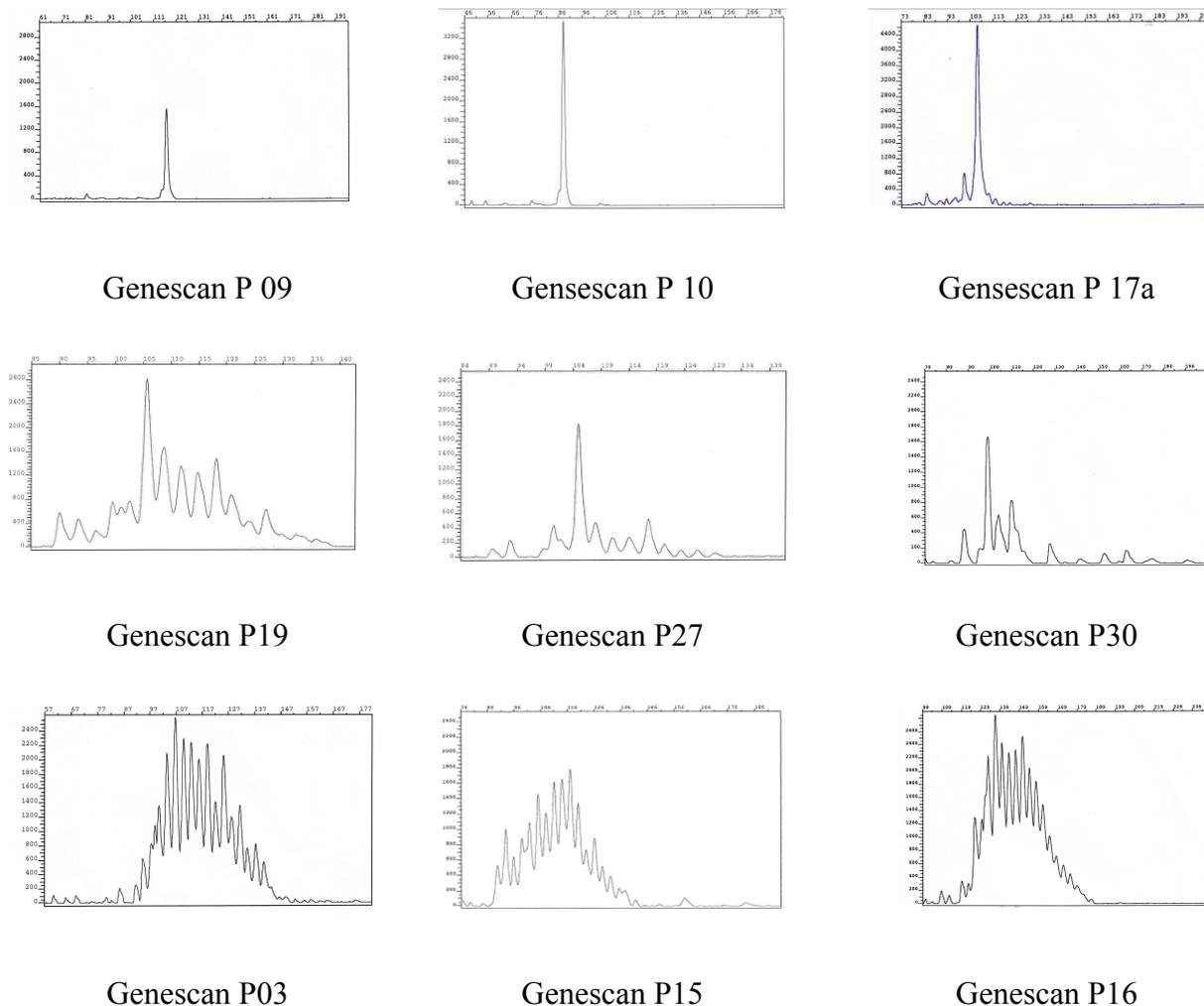


Abbildung 6: Darstellung charakteristischer Genescanbefunde bei der IgH-CDR3-Konsensus-PCR mit Fragmentlängen von 90 bis 144 Basenpaaren (bp). Auf der X-Achse ist die Größe in Basenpaaren gegen die relative Fluoreszenzintensität (RFU) auf der Y-Achse aufgetragen. In der ersten Reihe sind Fälle mit einem typischen monoklonalen Muster dargestellt (P 09, P 10 und P 17a). Reihe 2 zeigt Fälle mit einem monoklonalen Rearrangement vor einem polyklonalen Hintergrund (P 19, P 27 und P 30). Die letzte Reihe zeigt Beispiele für polyklonale PCR-Produkte (P 03, P 15 und P 16).

3.2.1 Vergleich der Detektionsraten in den verschiedenen Untersuchungsmaterialien

Hinsichtlich des Untersuchungsmaterials zeigten sich beachtliche Unterschiede bezüglich des Nachweises klonaler IgH-CDR3-Rearrangements. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde auf Knochenmark und/oder peripheres Blut, welches zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. des Rezidivs asserviert worden war, zurückgegriffen. Die Detektionsrate für monoklonale B-Zellen im Knochenmark lag bei 11/17 (65%), im

peripheren Blut bei 10/15 (67%). Im für die histologische bzw. zytologische Diagnosesicherung gewonnenen Tumormaterial (Lymphknoten, Liquor, Pleurapunktat) konnte in 8/9 Fällen (89%) eine klonale Tumorzellpopulation nachgewiesen werden. (Tabellen 10 und 11)

In fünf Fällen (P03, P14, P22, P23, P36) konnte ein Vergleich von KM und PB zum Zeitpunkt der Diagnose vorgenommen werden. Dabei zeigte sich in zwei Fällen eine Konkordanz der PCR-Befunde (P22, P36). In einem Fall (P14) wurde im KM eine klonale Lymphomzellpopulation detektiert, während dieser Nachweis im PB nicht gelang. In den beiden anderen Fällen (P03 und P23) konnte umgekehrt im KM ein polyklonales Signal, im PB hingegen ein monoklonales Signal detektiert werden. Eine Übereinstimmung zwischen dem PCR-Ergebnis aus der KM-Probe mit dem Ergebnis der Untersuchung von diagnostischem Tumormaterial konnte bei dem Patienten P28 (maligner Pleuraerguss) nachgewiesen werden.

3.2.2. Vergleich der Detektionsraten in Abhängigkeit vom klinischen Ausbreitungsstadium

Auffällig war, dass sich bereits in den lokalisierten Stadien I und II (gemäß der klinischen Stadieneinteilung nach Ann Arbor) in einem erheblichen Anteil klonale Lymphomzellpopulationen mittels PCR und Genescan-Fragmentanalyse sowohl im Knochenmark (2/17, 12%) als auch im peripheren Blut (4/15, 27%) nachweisen ließen, die der zytologischen bzw. histomorphologischen Diagnose entgangen waren.

In den Tabellen 9 und 10 sind die Detektionsraten mono-und polyklonaler IgH-CDR3-PCR-Produkte im peripheren Blut und Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Abhängigkeit vom klinisch-radiologischen Ausbreitungsstadium zusammengefasst.

| PB | Stadium I | Stadium II | Stadium III | Stadium IV | gesamt |
|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------|
| monoklonal | 3/15 (20%) | 1/15 (7%) | 1/15 (7%) | 5/15 (33%) | 10/15 (67 %) |
| polyklonal | 1/15 (7 %) | 1/15 (7%) | 2/15 (13%) | 1/15 (7%) | 5/15 (33%) |

Tabelle 9: Nachweis von mono-und polyklonalen IgH-CDR3-PCR-Produkten im peripheren Blut in Abhängigkeit vom klinischen Ausbreitungsstadium

| KM | Stadium I | Stadium II | Stadium III | Stadium IV | gesamt |
|-------------------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------|
| monoklonal | 1/17 (6%) | 1/17 (6%) | 1/17 (6%) | 8/17 (47%) | 11/17 (65%) |
| polyklonal | 3/17 (18%) | 2/17 (18%) | - | 1/17 (6%) | 6/17 (35%) |

Tabelle 10: Nachweis von mono- und polyklonalen IgH-CDR3-PCR-Produkten im Knochenmark in Abhängigkeit vom klinischen Ausbreitungsstadium

Der folgende Patientenverlauf veranschaulicht den praktischen Stellenwert der molekularen Methoden im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik.

3.2.2.1 Patient P36

Bei dem Patienten P36 wurde 03/1995 die Erstdiagnose eines centroblastischen B-NHL mit einem Befall beidseits cervical sowie mediastinal, entsprechend einem klinisch-radiologischen Stadium II A nach Ann Arbor, gestellt. Das diagnostische Lymphknotengewebe war für eine molekulargenetische Analyse leider nicht verfügbar. Obwohl die histomorphologische Begutachtung keinen Hinweis auf eine Knochenmarkinfiltration ergeben hatte, konnte sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmarkspirat mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR und der Genescan-Fragmentanalyse ein monoklonales Produkt mit einer Fragmentlänge von 144 bp vor einem erheblichen Hintergrund beigemischter polyklonaler B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Der molekulargenetische Nachweis von Lymphomzellen in peripherem Blut und Knochenmark spricht hiermit im Gegensatz zum Ergebnis des klinisch-radiologischen Initialstaging für eine systemische Manifestation der Erkrankung. Nachdem mittels einer Chemotherapie (6 Zyklen CHOP) zunächst eine komplette Remission der Erkrankung erreicht werden konnte, entwickelte der Patient zwei Jahre später, 04/97, ein Rezidiv im Bereich der Primärmanifestationen. Die molekulargenetische Analyse des Rezidiv-Lymphknotengewebes ergab den Nachweis des bekannten, 144 bp großen Fragments (siehe Abbildung 6). Dies beweist, dass nach einer unzureichenden Eradikation durch die Primärtherapie das Rezidiv der Erkrankung durch denselben Lymphomzellklon ausgelöst wurde. Nachdem mit einer Zweitlinien-Chemotherapie (6 Zyklen MIZE) zunächst eine partielle Remission erreicht worden war, relabtierte der Patient nur 3 Monate nach Abschluss dieser Behandlung erneut (Progreß links cervical) und wurde nachfolgend einer involved-field-Radiotherapie unterzogen (bis 04/98). Der weitere Verlauf ist nicht bekannt.

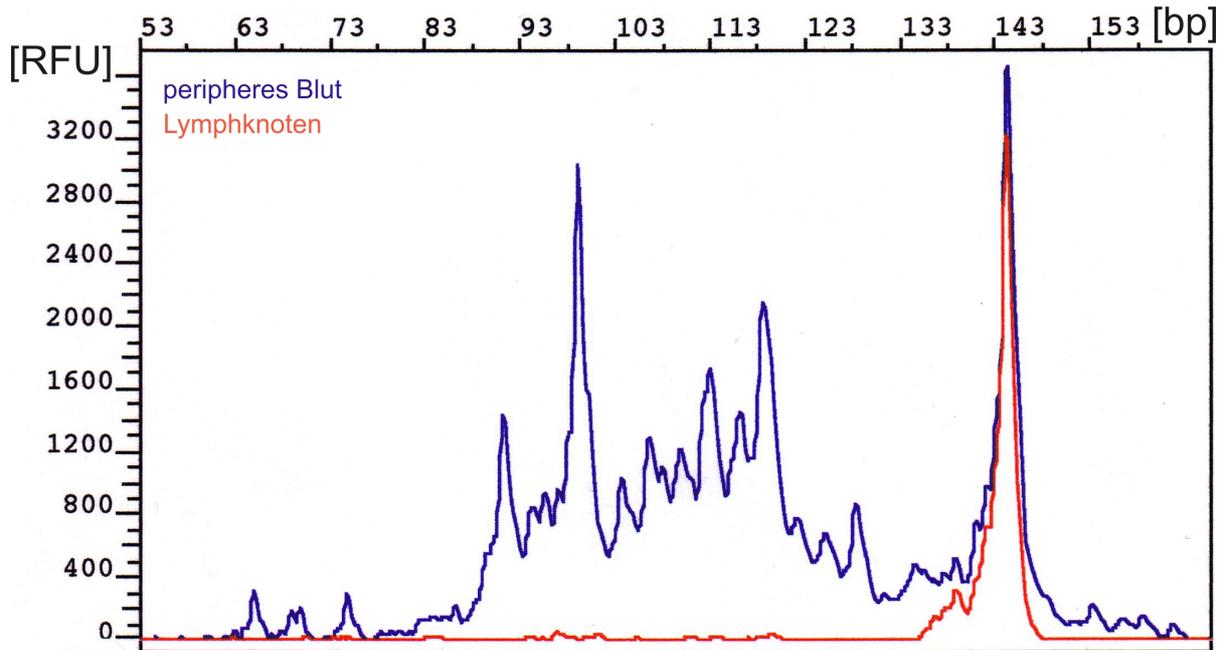


Abbildung 7: Auf der x-Achse ist die Grösse der PCR-Produkte in Basenpaaren (bp) gegen die relative Fluoreszenzaktivität (RFU) auf der y-Achse aufgetragen. In blau ist das Ergebnis einer Genescan-Fragmentanalyse von peripherem Blut des Patienten P36 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose dargestellt, in rot das Ergebnis der Analyse von Lymphknotenmaterial zum Zeitpunkt des ersten klinischen Rezidivs. In beiden Fällen konnte dasselbe 144 bp grosse Fragment nachgewiesen werden: im peripheren Blut als monoklonaler Peak vor einem polyklonalen Hintergrund beigemengter B-Zellen, im Lymphknotengewebe als eindeutig monoklonaler Peak. Dies beweist, dass es sich in beiden Fällen um denselben Lymphomzellklon handelt.

3.2.3 Vergleich der Detektionsraten in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

Es zeigten sich weiterhin innerhalb der Gruppe der DLCBL deutliche Unterschiede der Ergebnisse zwischen den einzelnen histologischen Subtypen bzw. Subentitäten. Die Detektionsrate zeigte eine Varianz von 1/4 (25%) bei anaplastischen Lymphomen (n=4) bis zu 3/3 (100%) bei immunoblastischen Lymphomen (n=3). In der Gruppe der centroblastischen Lymphome, die in dem zu untersuchenden Kollektiv die überwiegende Mehrheit ausmachte (n=35), konnte in 22/35 Fällen (63%) ein monoklonales Signal detektiert werden (Tabelle 11).

| histologische Subtypen | monoklonal | polyklonal | kein Produkt | gesamt (n=49) |
|------------------------|--------------|-------------|--------------|------------------|
| DLBCL | 25/41 (61 %) | 7/42 (17 %) | 9/42 (21 %) | 41 |
| - zentroblastisch | 22/35 (63 %) | 6/3 (17 %) | 7/35 (20 %) | 35 |
| - immunoblastisch | 2/2 (100 %) | - | - | 2 |
| - anaplastisch | 1/4 (25 %) | 1/4 (25 %) | 2/4 (50 %) | 4 |
| Burkitt-Lymphom | 2/4 (50 %) | 2/4 (50 %) | - | 4 |
| lymphoblastisch | 3/4 (75 %) | 1/3 (25 %) | | 4 |
| gesamt | 32 (63%) | 10 (20%) | 9 (17%) | 49 |

Tabelle 11: Nachweis von mono- und polyklonalen IgH-CDR3-PCR-Produkten im Knochenmark in Abhängigkeit vom jeweiligen histologischen Subtyp gemäß der WHO-Klassifikation

3.3 Sequenzierung

Zur Identifikation klonaler Sequenzen, die für die Konstruktion patientenspezifischer PCR-Primer geeignet sind, wurden ausgewählte PCR-Produkte von insgesamt 9 Patienten sequenziert (P09, P10, P17 a und b, P22, P26, P28, P31, P39, P 44). Die Auswahl richtete sich dabei nach dem Befund der Fragmentanalyse (monoklonal, monoklonal vor polyklonalem Hintergrund) und dem Vorhandensein von Verlaufsmaterialien. Zur Sequenzanalyse kamen drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung:

Die PCR-Produkte von drei Patienten konnten direkt sequenziert werden. Von fünf weiteren Patienten wurden die PCR-Produkte nach einer präparativen TGGE und Eluation des klonspezifischen PCR-Produktes direkt in die Cycle Sequencing Reaktion eingesetzt. Von sieben Patienten wurden acht IgH-CDR3-PCR-Produkte (P22: KM und PB) nach einer Klonierung in *E. coli* sequenziert.

In Tabelle 14 (Anhang) sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen dargestellt. Die Zuordnung der V_H-, D_H- und J_H-Segemente und die Identifizierung der N-Regionen erfolgte nach Keimbahnsequenzen aus der Literatur (Ravetch et al. 1981, Sanz 1991, Elgavesh et al. 1993, Mattila et al. 1995, Tomlinson et al. 1995, Linke 1997b).

3.3.1 Direkte Sequenzierung

In den Fällen, bei denen in der Genescan-Analyse ein dominanter IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkt-, „Peak“ ohne polyklonalen Hintergrund erhalten wurde, war eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte mit der Cycle Sequencing-Methode möglich. Auf diese Weise wurden 3 IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkte direkt sequenziert. Die Genescanbefunde der IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkte der Fälle P09, P10 und P17b sind in Abbildung 6 zur Veranschaulichung dargestellt (s.o.).

3.3.2 Sequenzierung nach PCR-TGGE

In einigen Fällen war aufgrund des Vorhandenseins polyklonaler PCR-Produkte eine direkte Sequenzierung nicht ohne weiteres möglich. Da die Klonierung und anschließende Sequenzierung von PCR-Produkten jedoch sehr arbeits- und zeitaufwendig ist, wurde in einigen Fällen (P17a, P28, P39, P44), bei denen in der Genescan-Analyse ein dominanter monoklonaler Peak vor einem kleineren polyklonalen Hintergrund detektiert worden war, der Versuch unternommen, die TGGE als präparative Methode zu benutzen, um auf diese Weise die PCR-Klonierung zu umgehen.

Abbildung 8 zeigt die TGGE der PCR-Produkte der genannten Patienten nach Silberfärbung des PAA-Gels.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

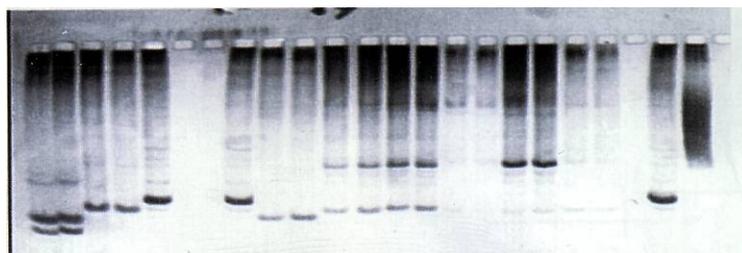


Abbildung 8: Darstellung der Analyse von IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkten durch eine TGGE (siehe). Folgende Proben wurden in den nachfolgenden Spuren aufgetragen (in Klammern DNA-Nummer):

| | | |
|-----------------------------|--------------------|---------------------------|
| 1+2: P10 (1612) | 11+12: P17a (1543) | 19+20: P25 (1341) |
| 3+4: P28 (1809) | 13+14: P39 (1996) | 22: P22 (1096) |
| 5+8: P44 (1880) | 15+16: P31 (1334) | 23: polyklonale Kontrolle |
| 9+10: monoklonale Kontrolle | 17+18: P32 (1685) | |

Beide Verfahren, die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten sowie die Sequenzierung nach einer präparativen TGGE, lieferten gut lesbare Sequenzen, die eine eindeutige Bestimmung und Zuordnung der D_H- und J_H-Segmente erlaubten und damit die Charakterisierung der spezifischen N-Regionen ermöglichten. Aufgrund der Lage des V_H-Konsensus-Primers war die Zuordnung zu den entsprechenden V_H-Segmenten nicht möglich.

3.3.3 Sequenzierung nach PCR-Klonierung

Es wurden die IgH-CDR3-PCR-Produkte von 7 Patienten für die Klonierung ausgewählt (P 17a, P20, P22, P25, P26, P31, P44).

In den Fällen P17a und P44, in denen eine direkte Sequenzierung nicht möglich gewesen war, wurden parallel zu dem Versuch der Sequenzierung nach einer präparativen TGGE die entsprechenden PCR-Produkte kloniert und sequenziert. Die anschließende Sequenzanalyse zeigte bei einem Teil der erhaltenen Klone eine Übereinstimmung der Sequenzen und bestätigte damit das Ergebnis der TGGE-Sequenzierung.

Im Fall P17a fanden sich unter 8 sequenzierten Plasmiden 2 weitgehend sequenzhomologe Klone. Während die Sequenzanalyse des ersten Plasmids eine eindeutige Bestimmung der verwendeten D_H- und J_H-Segmente und damit die genauere Charakterisierung der spezifischen N-Nukleotide erlaubte, brach die Sequenz des zweiten Plasmids mitten in der N₂-Region ab, so dass eine Bestimmung des J_H-Segments in diesem Fall nicht möglich war. Diese beiden Sequenzen wurden durch das Ergebnis der TGGE-Sequenzierung bestätigt. Die Genescan-Fragmentanalyse bestätigte das entsprechende monoklonale Rearrangement. Bei zwei weiteren sequenzidentischen Plasmiden konnte ebenfalls eine Zuordnung von D_H und J_H-Segmenten erfolgen, doch stimmte die ermittelte Fragmentlänge nicht mit der anhand der Sequenzdaten errechneten Größe überein. Interessanterweise fand sich eine Übereinstimmung dieser Sequenzen mit denen der Probe P17b. Bei drei weiteren sequenzhomologen Plasmiden mit einem J_H4-Segment im 3'-Bereich war eine weitergehende Sequenzanalyse der N₁-D_H-N₂-Verknüpfung nicht möglich.

Bei der Patientin P20 konnte bei drei Plasmiden eindeutig das J_H5-Segment zugeordnet werden. Eine weitergehende Charakterisierung der N₁-D_H-N₂-Verknüpfung war nicht möglich, da kein entsprechendes D_H-Segment identifiziert werden konnte. Zwei dieser

Sequenzen wiesen in diesem Bereich weitgehende Sequenzhomologien auf, die dritte Sequenz war hingegen komplett verschieden.

In Übereinstimmung mit den monoklonalen Genescan-Befunden konnten bei der Patientin P22 in 6/8 bzw. 2/7 Fällen sequenzidentische Klone nachgewiesen werden. Es wurden zwei unterschiedliche D_H -Segmente (LR3/LR4/XP2) und damit drei spezifische N-Regionen bestimmt, wobei die N_3 -Region im Bereich der D_H - N_3 - J_H -Verknüpfung nur zwei Nukleotide umfasst.

Im Falle des Patienten P25 konnten unter den 7 untersuchten Plasmiden des IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produktes keine übereinstimmenden Sequenzen gefunden werden, obwohl die Genescan-Fragmentanalyse einen deutlich monoklonalen Peak vor einem relativ geringen polyklonalen Hintergrund vermuten ließ. In drei Fällen konnte ein J_H -Segment zugeordnet werden; eine weitergehende Sequenzanalyse der junktionalen Regionen war nicht möglich.

Die Sequenzierung des IgH-CDR3-PCR-Produktes des Patienten P26 erbrachte den Nachweis von vier sequenzidentischen Plasmiden und bestätigte damit die Monoklonalität. Dabei konnte nur im Bereich der V_H - D_H -Junktion eine spezifische N_1 -Region identifiziert werden.

In Abbildung 9 ist beispielhaft anhand von Untersuchungsmaterial des Patienten P26 das Ergebnis der Sequenzierung nach einer PCR-Klonierung gezeigt.

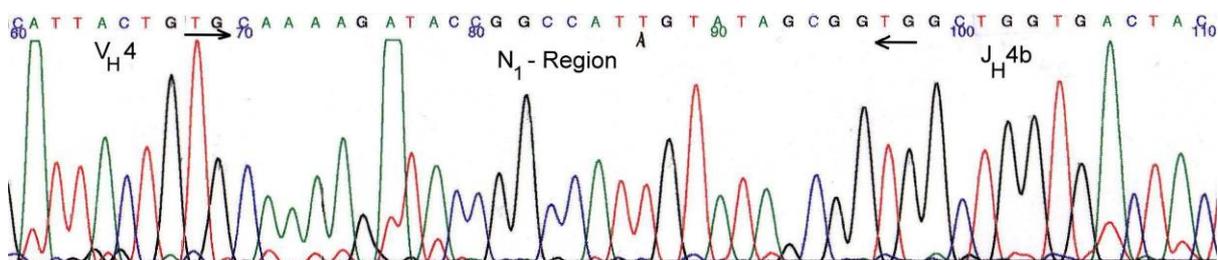


Abbildung 9: Sequenz eines IgH-CDR3-PCR-Produktes (Fall P26). Durch Pfeile sind die Bereiche der klonspezifischen V_H - N_1 - D_H - J_H -Region gekennzeichnet. In dargestellten Fall konnte im Bereich der D_H - J_H -Junktion keine spezifische N_2 -Region identifiziert werden.

Im Falle des Patienten P31 wurden vier weitgehende sequenzhomologe Plasmide identifiziert. Unterschiede fanden sich im 5'-Bereich der N_1 -Region, wo sich bei jeweils zwei Sequenzen

ein G- bzw. ein A-Nukleotidaustausch nachweisen liessen, sowie im D_H-Segment HQ 52, wo sich ebenfalls ein einzelner Nukleotidmismatch zeigte. Eine N₂-Region im Bereich der D_H-J_H-Verknüpfung konnte nicht identifiziert werden.

3.3.4 Analyse der sequenzierten IgH-CDR3-Regionen

Ein Vergleich der gewonnenen Sequenzdaten mit bislang bekannten Nukleotidsequenzen von D_H- und J_H-Keimbahngensegmenten (Ravetch et al. 1981, Buluwela et al. 1988, Ichihara et al. 1988, Sanz 1991, Elgavesh et al. 1993, Mattila et al. 1995, Tomlinson et al. 1995, Corbett et al. 1997, Linke 1997b) erlaubte die Zuordnung einzelner Gensegmente sowie die Identifikation der klonspezifischen N-Regionen.

Die Länge der einzelnen N-Regionen variierte zwischen 0 und 25 bp, mit einer durchschnittlichen Länge von 9 bp. Dabei unterschied sich jede N-Region in Basenfolge und -anzahl von den übrigen N-Regionen. In den Fällen P26 und P31 konnten im Bereich der D_H-J_H-Junktion keine N-spezifischen Nukleotide identifiziert werden, obwohl sich bei P31 das D_H-Element eindeutig charakterisieren ließ. Im Fall P22 ließen sich zwei verschiedene D_H-Segmente innerhalb einer junktionalen Sequenz nachweisen.

3.4 Patientenspezifische N-PCR

3.4.1 Auswahl der allel-spezifischen Oligonukleotide

Anhand der Sequenzdaten von neun Patienten wurden 10 patientenspezifische Oligonukleotide konstruiert. Die Tabelle 15 (Anhang) zeigt die Sequenz der junktionalen Regionen und die Position der klonspezifischen Primer. Dabei sind die Sequenzen dieser jeweiligen Primer, die in Tabelle 11 nachfolgend zusammengefasst sind, komplementär invers zur dargestellten markierten Nukleotidsequenz der Bruchpunktregionen.

| Patient | Bezeichnung | Sequenz (5' – 3') |
|---------|-------------|-------------------------------------|
| P09 | WB.1 | 5' ATC AAA AGC ATC GAA GGG AC 3' |
| P10 | AC.1 | 5' CCT GGC CCC AGT GGT CGT 3' |
| P17a | HA.1 | 5' CAA AGA AGT AAT AGC AGT AGT C 3' |
| P17b | KH.1 | 5' CAA AAG CGT AGT CAG TGC CT 3' |
| P22 | RK.3 | 5' AAT AAT ACT ACT AGG GAG TCG 3' |
| P26 | NL.1 | 5' CTA TAC TAT GGC CGG TAT CT 3' |
| P28 | HP.1 | 5' CCA GTT AGT CCA GGT GCT AC 3' |
| P31 | WR.1 | 5' GCT GCT CCA CCC TGC TCG 3' |
| P39 | AS.1 | 5' GTA GTA GTA CCT TGA GTG C 3' |
| P44 | HUW.1 | 5' TCA AAA GCA TCG ATG CCG GTA G 3' |

Tabelle 11: Sequenzen der Allel-spezifischen Oligonukleotide

Es zeigt sich, dass die N-Primer NL1 (P26), KH1 (P17b) und AC1 (P10) an ihrem 3'-Ende zwar ein Purin (A/T) aufweisen, doch bei den jeweils letzten 3 Nukleotiden am ihrem 3'-Ende die Pyrimidine (G/C) überwiegen. Lediglich der N-Primer NL1 weist in diesem Bereich nur ein Pyrimidin auf.

Die N-Oligonukleotide der CDR3-Sequenzen überspannen in der Regel die Bruchpunktregion im Bereich der N₂-J_H-Region. Im Fall P44 war die Länge der N₂-Region mit 25 bp lang genug, so dass die patientenspezifische Sequenz dort ausgewählt wurde. Bei der Patientin P 22, bei der zwei verschiedene D_H-Elemente identifiziert worden waren, wurde der N-Primer im Bereich der N₂-D_{H2}-Junktion positioniert. In zwei Fällen (P26, P31) konnte keine N₂-Region identifiziert werden, so dass der jeweilige N-Primer sich entweder über die N₁-D_H-Region erstreckt (P26) oder in der N₁-Region (P31) lokalisiert ist.

3.4.2. Prüfung der Spezifität der Patienten-spezifischen Oligonukleotide

Die PCR-Bedingungen müssen für jeden klonspezifischen Primer zusammen mit dem V_H-Konsensus-Primer individuell festgelegt werden.

Danach konnten 7/10 der klonspezifischen Oligonukleotide als „spezifisch bindend“ (AC.1, HA.1, KH.1, RK.3, NL.1, HP.1, AS.3) eingeordnet werden. Bei den übrigen drei Oligonukleotiden (WB.1, WR.1, HUW.1) waren auch in den polyklonalen Kontrollen Fragmente im erwarteten Größenbereich detektierbar. Versuche, die Spezifität durch Erhöhung der Annealingtemperatur oder Verkürzung der Extensionsdauer zu steigern, waren nicht erfolgreich, so dass diese Patienten für die weiteren MRD-Analysen nicht berücksichtigt werden konnten.

Die Tabelle 12 zeigt die Reaktionsbedingungen für die durchgeführten Verlaufsuntersuchungen.

| Patient | N-Primer | Annealing-Temperatur | Zyklenzahl | Fragmentlänge der N-PCR-Produkte (in Basenpaaren) |
|----------------|-----------------|-----------------------------|-------------------|--|
| P09 | WB.1 | 58°C | 25 | 74 |
| P10 | AC.1 | 58°C | 25 | 60 |
| P17a | HA.1 | 55°C | 30 | 59 |
| P17b | KH.1 | 60°C | 25 | 75 |
| P22 | RK.3 | 58°C | 25 | 73 |
| P26 | NL.1 | 58°C | 28 | 51 |
| P28 | HP.1 | 58°C | 25 | 59 |
| P31 | WR.1 | 58°C | 25 | 46 |
| P39 | AS.1 | 60°C | 25 | 47 |
| P44 | HUW.1 | 58°C | 25 | 86 |

Tabelle 12: PCR-Bedingungen und Oligonukleotide für die patientenspezifische N-PCR

3.4.3 Semiquantitative PCR

3.4.3.1 Prinzip

Für einen quantitativen Vergleich wurden in einem semiquantitativen Verfahren die Verlaufsmaterialien eines Patienten auf eine Verdünnungsreihe des primärdiagnostischen

Materials bezogen. Die Verdünnungsstufe, bis zu der sich ein spezifischer „Peak“ nachweisen ließ, entsprach der unteren Nachweisgrenze.

3.4.3.2 Molekulargenetische Verlaufsuntersuchungen

Es wurden insgesamt 6 Patienten ausgewählt (P10, P17a und b, P22, P26, P28, P39), bei denen mittels klonspezifischer PCR Verlaufsmaterialien (peripheres Blut, Knochenmark und bei zwei Patienten (P10, P26), die einer autologen Blutstammzelltransplantation zugeführt wurden, auch Leukaphereseprodukte), die während und nach Abschluss der Therapie gesammelt worden waren, auf das Vorhandensein von residuellen Lymphomzellen hin untersucht werden konnten. Die verschiedenen N-PCR-Assays zeigten dabei hinsichtlich der Sensitivität beträchtlicher Unterschiede (10^{-2} bis 10^{-5}). Residuelle Lymphomzellen (MRD) konnten bei 5/6 Patienten bis zu 36 Monate nach Abschluss der Therapie nachgewiesen werden. 2/6 Patienten verstarben, ohne überhaupt eine Remission erreicht zu haben (P17, P28). Zum Zeitpunkt des Abschlusses der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit befanden sich 4/6 Patienten trotz des molekulargenetischen Nachweises residueller Lymphomzellen weiterhin in klinischer Remission (P10, P22, P26, P39). Dazu gehören ebenfalls die beiden Patienten mit einem indolenten Lymphom, die einer Hochdosistherapie mit anschließender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation zugeführt worden waren. Nur eine Patientin mit einem Burkitt-Lymphom (P22) wurde bereits nach zwei Zyklen einer intensiven konventionellen Polychemotherapie MRD-negativ und befand sich im weiteren Verlauf in anhaltender klinischer und molekularer Remission.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen MRD-Verlaufsuntersuchungen sind graphisch in Abbildung 10 dargestellt.

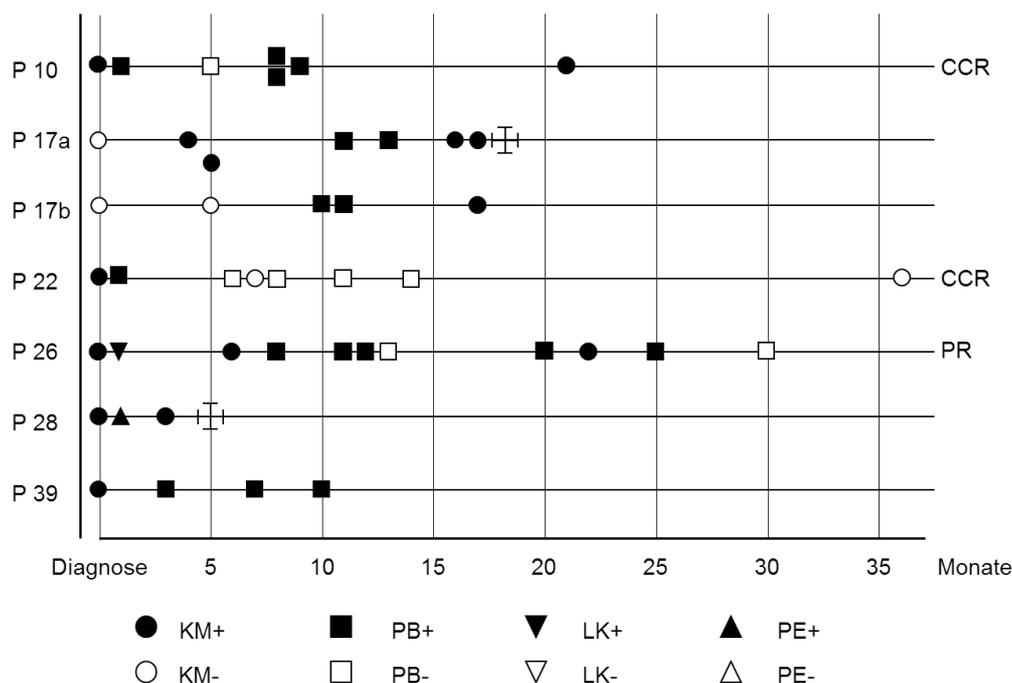


Abbildung 10: Graphische Darstellung der MRD-Verläufe der untersuchten Patienten während und im Anschluss an die Therapie. Die Nachbeobachtungsdauer betrug bis zu 36 Monate.

Exemplarisch wird nachfolgend ein Patientenverlauf dargestellt und dabei das klinische Ansprechen mit den Ergebnissen der MRD-Untersuchungen korreliert.

3.4.3.2.1 Patient P26

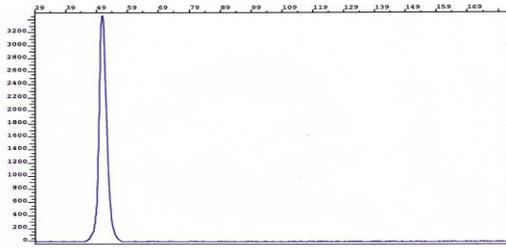
Klinischer Verlauf:

Im November 1994 wurde die Diagnose eines indolenten B-NHL, speziell eines Marginalzonenlymphoms des Magens, mit einer primären Knochenmarkinfiltration, entsprechend einem klinisch-radiologischen Stadium IV B, gestellt. Aufgrund der ungünstigen Prognose wurde nach Erreichen einer partiellen Remission nach der primären Chemotherapie (6 x CHOP) die Indikation für eine Hochdosistherapie mit nachfolgender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT) gestellt, die 12/95 erfolgte. Danach befand sich der Patient klinisch in einer kompletten Remission. Im August 2000 wurde ein Lokalrezidiv diagnostiziert und daraufhin eine lokale Radiotherapie durchgeführt. Vier Jahre später, 04/04, wurde im Rahmen einer Kontroll-Gastroskopie ein weiteres lokales Rezidiv im Bereich des Duodenums festgestellt. Nach der Gabe von vier Zyklen einer kombinierten Immun-/Chemotherapie (Rituximab-FCM) konnte 11/04 eine komplette klinische Remission dokumentiert werden (Stand 11/04).

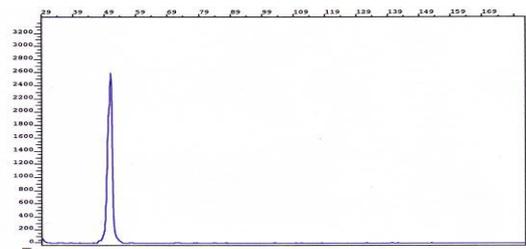
Molekulargenetischer Verlauf:

Mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR ließ sich im primärdiagnostischen Knochenmarkaspirat (11/94) ein 108 bp großes, spezifisches Amplifikat generieren. Nach PCR-Klonierung und anschließender Sequenzierung wurde ein klonspezifisches Oligonukleotid synthetisiert (Oligo NL.1), das in den nachfolgenden N-PCRs zur molekulargenetischen Verlaufsbeurteilung eingesetzt wurde. Die Länge des N-PCR-spezifischen Produktes betrug 51 bp, die Sensitivität des Assays lag bei 10^{-3} . Nach Abschluss der Primärtherapie 05/95 wurde klinisch-radiologisch eine partielle Remission dokumentiert. Molekulargenetisch konnte im morphologisch unauffälligen Knochenmark hingegen eine residuelle Lymphominfiltration nachgewiesen werden. Unmittelbar vor Durchführung der autologen PBSCT (12/95) war der MRD-Nachweis im peripheren Blut weiterhin positiv, und auch nach erfolgter PBSCT blieben residuelle Lymphomzellen im peripheren Blut und im Knochenmark zu verschiedenen Zeitpunkten nachweisbar. Lediglich in einer Probe aus dem peripheren Blut, entnommen 10 Tage nach der PBSCT, zeigte die N-PCR kein Signal. Da die nachfolgenden Proben jedoch alle wieder ausnahmslos MRD-positiv waren, lag der Tumorzellgehalt in dieser Probe wahrscheinlich nur knapp unterhalb der Nachweisgrenze. Das molekulargenetische Follow-up endete 05/97. Der Patient befand sich zu diesem Zeitpunkt in einer klinischen kompletten Remission.

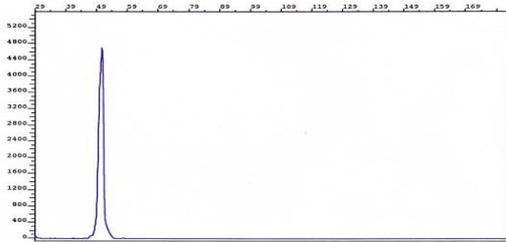
Der geschilderte MRD-Verlauf wird in der Abbildung 11 graphisch veranschaulicht:



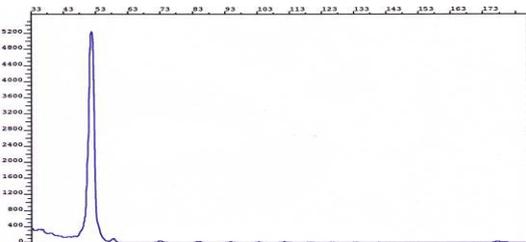
KM bei Erstdiagnose



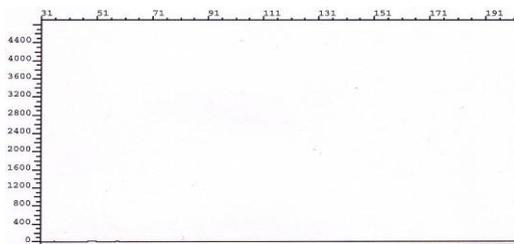
LK bei Erstdiagnose



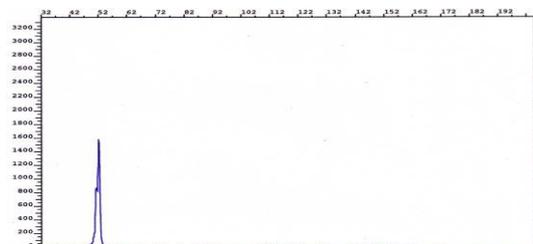
PB nach 6 x CHOP



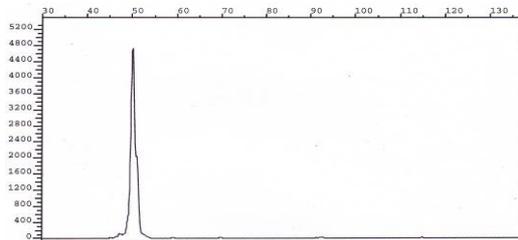
PB vor autologer PBSCT



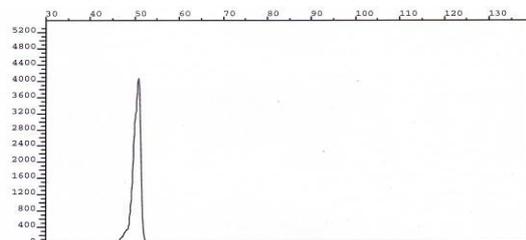
PB 10 Tage nach PBSCT



PB 8 Monate nach PBSCT



PB 12 Monate nach PBSCT



PB 17 Monate nach PBSCT

Abbildung 11: Nachweis der Lymphomzellklon-spezifischen IgH-CDR3-Sequenz des Patienten P26 mittels N-PCR und Genescananalyse bei Diagnosestellung, nach Abschluss der konventionellen Chemotherapie, nach Hochdosistherapie und in einem Zeitraum von 18 Monaten nach autologer PBSCT. Auf der x-Achse ist die Grösse der PCR-Produkte in Basenpaaren (bp) gegen die relative Fluoreszenzaktivität (RFU) auf der y-Achse aufgetragen.

4. DISKUSSION

Die Einführung neuer zytogenetischer, immunologischer und molekulargenetischer Untersuchungsmethoden hat nicht nur die diagnostischen Möglichkeiten erheblich erweitert, sondern erlaubt auch neue Einblicke in die Biologie aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die Analyseverfahren, die auf dem molekulargenetischen Nachweis spezifischer Chromosomentranslokationen sowie rearrangierter Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen, haben aufgrund ihrer breiten Einsetzbarkeit, Spezifität und Sensitivität große Bedeutung erlangt. Ihr Einsatzgebiet besteht neben der molekularen Klonalitätsanalyse zum Zeitpunkt der Diagnose in der Bestimmung von minimaler Resterkrankung (MRD) während und nach Abschluss einer Therapie.

Der Stellenwert dieser neuen molekulargenetischen Techniken in der Diagnostik und Therapie maligner Lymphome ist im Gegensatz zu den akuten lymphatischen Leukämien (ALL) weiterhin nicht ausreichend geklärt (Pott et al. 2013). Bezüglich der histologischen, immunologischen und molekularen Subtypen, der Vielfalt der Krankheitsverläufe und der therapeutischen Möglichkeiten stellen die NHL eine äußerst heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Das Nebeneinander nicht kompatibler und somit konkurrierender Klassifikationssysteme sowie uneinheitliche Einschlusskriterien für klinische Studien erschweren über viele Jahre ebenso sehr die Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten wie die fehlende methodische Homogenität (Corradini et al. 1999). Die hauptsächlichsten Unterschiede liegen dabei in den ausgewählten molekularen Markern, den Methoden zur Klonalitätsanalyse zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, den Nachweismethoden zur MRD-Verlaufsbeobachtung, deren Spezifität und Sensitivität, sowie in den MRD-Schwellenwerten, die als klinisch signifikant angesehen wird.

Die auf PCR-Verfahren beruhenden MRD-Untersuchungen wurden bislang fast ausschließlich bei indolenten NHL, und dabei v.a. bei folliculären- und Mantelzell-Lymphomen vorgenommen, die mit den Chromosomentranslokationen t(14;18) bzw. t(11;14) über spezifische molekulare Marker verfügen (Gribben et al. 1994, Andersen et al. 1997). Da die Methoden, die auf dem PCR-Nachweis von Rearrangements der IgH- und T-Zell-Rezeptor-Gene basieren, wesentlich komplizierter und arbeitsaufwendiger sind, liegen hierzu

bislang deutlich weniger Daten vor (Zwicky et al. 1996, van Belzen et al. 1997, Scholten et al. 1997, Kanteti et al. 1999, Jacquy et al. 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die von unserer Arbeitsgruppe entwickelten halbautomatischen Verfahren zum Nachweis von MRD mittels Genescan-Fragmentanalyse und klonspezifischer N-PCR weiterentwickelt (Kneba et al. 1995, Rothaupt 1995, Linke et al. 1995a, Linke et al. 1997 a und b). Dabei wurde zunächst diagnostisches Gewebe eines größeren Kollektivs von Patienten mit einem DLBCL bzw. Burkitt-Lymphom mittels IgH-PCR und Genescanning untersucht. Die nachfolgende Sequenzierung erlaubte die molekulare Charakterisierung des Tumorzellklons und die Konstruktion von patientenspezifischen Primern zum Nachweis von MRD in Verlaufsmaterialien mit einem semiquantitativen PCR-Verfahren.

Die diagnostischen Materialien von 49 untersuchten Patienten enthielten in 45 Fällen amplifizierbare DNA, nachgewiesen durch die IgH-CDR3-Konsensus-PCR oder, wie in 5 Fällen, nur durch eine β -Actin-PCR. Insgesamt wiesen damit auswertbare 40/45 (89 %) Patienten ein positives Ergebnis im Sinne eines mittels Agarosegelelektrophese nachweisbaren Amplifikationsproduktes auf. Die übrigen vier Materialien, die weder ein IgH-Rezeptorgen-Rearrangement noch eine positive β -Actin-PCR aufwiesen, wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Als Ursache für die unzureichende DNA-Qualität kommen eine Degradation der DNA, beispielsweise durch das den Knochenmarkaspiraten beigefügte Heparin, oder durch die Art der Fixierung aber auch ein Verlust von DNA im Rahmen der DNA-Extraktion in Frage (Diss et al. 1993, Slack et al. 1994, Födinger et al. 1999, Camilleri-Broet et al. 2000). Weiterhin ist auch eine ungleichmäßige Verteilung von Lymphomzellen in der untersuchten Gewebeprobe („sampling error“) und infolgedessen eine unzureichende Anzahl amplifizierbarer B-Zellen ursächlich möglich (Slack et al. 1994, Rockman 1997, Derksen et al. 1999, Maes et al. 2000).

Nach Abzug der Fälle, in denen keine für die PCR geeignete DNA zur Verfügung stand, konnte mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR in 20/45 (44 %) Fällen ein monoklonales Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. In 20/45 (44 %) Fällen wurde ein polyklonales Produkt generiert.

Dieser relativ geringe Prozentsatz von 44 % an monoklonalen IgH-CDR3-Konsensus-PCR-Produkten bezogen auf die Gruppe der DLBCL steht im Einklang mit in der Literatur publizierten Daten (Aubin et al. 1995, Catherwood et al. 2003, Derksen et al. 1999, Evans et al. 2007, Hoshino et al. 2004, Ilgenfritz et al. 2009, Jacquy et al. 2000, Liu et al. 2007, Wu et al. 1997). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird dadurch erschwert, dass zum einen in den meisten Publikationen zum Teil sehr heterogene Kollektive untersucht wurden, bei denen es sich minderheitlich um Proben von aggressiven Lymphomen handelte, und zum anderen dabei unterschiedliche Methoden und Primer bzw. Primerkombinationen zur Anwendung kamen.

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Kneba et al. 1995, Rothaupt 1995, Linke et al. 1997) wurde mit der Genescan-Fragmentanalyse ein weitgehend automatisiertes und nicht-radioaktives Verfahren zur Klonalitätsanalyse von Immunglobulinen-Rearrangements mit der Möglichkeit einer anschließenden direkten Sequenzierung von monoklonalen PCR-Produkten etabliert und ihr Einsatz anhand der Untersuchung klinischer Materialien überprüft. Bislang wurden nur wenige umfangreichere Untersuchungen für den Klonalitätsnachweis mittels Genescanning bei Lymphomen veröffentlicht (Linke et al. 1997a, Ayling et al. 1999, Zhou et al. 1999, Kremer et al. 2000, Gleissner et al. 2001, Evans et al. 2007).

Mit dieser Methode konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei 30/45 (67%) Patienten mit PCR-geeigneter DNA ein monoklonales Rearrangement nachgewiesen werden. Dies entspricht, im Vergleich zu den Ergebnissen der IgH-CDR3-Konsensus-PCR einer Steigerung der Gesamtdetektionsrate monoklonaler Lymphomzellpopulationen um 23% von 44% auf 67%. In der Arbeit von Gleissner et al. war diese Verbesserung mit einer Steigerung der Detektionsrate um 5% nicht so ausgeprägt, was am ehesten mit der Heterogenität des untersuchten Kollektivs an NHL erklärt werden kann (Gleissner et al. 2001).

In der vorliegenden Untersuchung konnte in 10 Fällen, die nach der Agarosegelelektrophorese als polyklonal gewertet worden waren, nun ein monoklonales Signal vor einem polyklonalen Hintergrund detektiert werden. Zurückzuführen ist dies auf die besonders gute Auflösung der relativ kleinen IgH-CDR3-PCR-Produkte (80-150 bp) im 6%-igen Polyacrylamid-Gel (Aubin et al. 1995, Kneba et al. 1995, Linke et al. 1997a, Derksen et al. 1999, Ayling et al. 1999, Zhou et al. 1999). Im Vergleich zur Agarosegelelektrophorese sind kaum subjektive Interpretationen der Befunde möglich (Ayling et al. 1999). Auch ist eine Beurteilung der

DNA-Qualität möglich: Unterbrechungen bzw. ein Abfall der Fluoreszenzaktivität bis auf die Grundlinie weisen auf eine Degradation der DNA hin (Linke 1997b). Im Vergleich zur IgH-CDR3-Konsensus-PCR liegt die Sensitivität der Genescan-Analyse um eine log-Stufe höher (Zhou et al. 1999). Die konventionellen PCR-Assays sind vor diesem Hintergrund zur Klonalitätsanalyse nicht ausreichend (Kneba et al. 1995, Linke 1997b, Kerlan-Candon et al. 1998, Langerak et al. 2001). Diese verbesserte Sensitivität und Spezifität der Genescan-Fragmentanalyse ist von großer Bedeutung für die Wahl der nachfolgenden Sequenzierungsstrategie (s.u.).

Auf einige besondere Aspekte und Probleme bei der Klonalitätsanalyse von DLBCL soll nachfolgend ausführlicher eingegangen werden.

Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass das Ergebnis und die Validität eines PCR-Assays durch präanalytische und analytische Faktoren bestimmt werden, wie beispielsweise der histologische Lymphom-Subtyp, die zu untersuchende Gewebeprobe, die Auswahl der PCR-Primer und die PCR-Bedingungen (Diss et al. 1993, Inghirami et al. 1993, Slack et al. 1994, de Re et al. 1995, Segal 1996, Födinger et al. 1999, Derksen et al. 1999, Camilleri-Broet et al. 2000, Maes et al. 2000, Bagg et al. 2002).

Bei Verwendung von Konsensus-Primern liefert die IgH-FR3-PCR in 15-35% der Fälle bei der Untersuchung von B-NHL ein falsch-negatives Ergebnis, was vor allem auf Primer-Mismatches in den V_H - und J_H -Zielregionen zurückgeführt wird (Diss et al. 1993, Inghirami et al. 1993, Slack et al. 1994, Achille et al. 1995, Aubin et al. 1995, Linke et al. 1995b, Segal 1996).

Überwiegend beschränkten sich die Versuche, die Spezifität und Sensitivität der PCR-Assays zu steigern, auf die Verwendung alternativer Primerkombinationen, in denen die Lokalisation des V_H -Primers variiert wurde (FR1, FR2). Trotz dieses großen technischen Aufwandes wurde eine maximale Detektionsrate von 100% nie erreicht (Aubin et al. 1995, Derksen et al. 1999, Födinger et al. 1999, Theriault et al. 2000). Umfangreiche Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe hatten sich deshalb darauf konzentriert, den im Vergleich am wenigsten aufwendigen IgH-CDR3 (FR3)-PCR-Assay zu optimieren. Unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität („proofreading“-Aktivität) konnte die Spezifität und Sensitivität der Amplifikationsreaktion zwar erheblich gesteigert werden

(Linke 1995b), doch die Ergebnisse der vorliegenden wie auch anderer Arbeiten zeigen, dass speziell in der Gruppe der DLBCL die Rate an falsch-negativen Ergebnissen dennoch weiterhin zwischen 30-35% liegt (Gurbity et al. 2003, Kosari et al. 2013).

Die Differenzierung zwischen verschiedenen histologischen Lymphom-Subentitäten erlaubte dabei die Unterscheidung zwischen drei Gruppen: eine Detektionsrate von > 85% wurde für die CLL bzw. das lymphozytische Lymphom/Immunozytom, das Mantelzelllymphom (MCL) und für Burkitt-NHL beschrieben. Für akute lymphatische Leukämien (ALL), das Multiple Myelom (MM) und MALT-NHL wurde eine Detektionsrate von 60-84% beschrieben. Im Unterschied dazu konnte bei follikulären Lymphomen (FL) und DLBCL nur in <60% ein positives Ergebnis erzielt werden. (Lombardo et al. 1996, Segal et al. 1996).

Diese Ergebnisse wurden durch molekulargenetische und immunphänotypische Untersuchungen bestätigt und ergänzt. Von besonderer Bedeutung ist das Ausmaß somatischer Hypermutationen im IgH-Genkomplex, die bei proliferierenden B-Zellen im Rahmen der Auseinandersetzung mit einem Antigen im Keimzentrum („germinal center“, GC) erfolgen („affinity maturation“, „receptor editing“; Storb 1998).

Keimzentrums-naive B-Zellen (pre-GC-Typen, z.B. Vorläufer-B-ALL, MCL, CLL/SLL) exprimieren unmutierte V_H -Gene und weisen eine höhere Detektionsrate auf als sog. memory-B-Zellen (GC/post-GC-Typen, z.B. MALT-NHL, FL, MM, DLBCL), die somatisch hypermutierte V_H -Gene aufweisen (Küppers et al. 1997, Theriault et al. 2000, Uchiyama et al. 2003). Bei mehr als 10% Hypermutationen ist eine IgH-PCR-Analyse nicht mehr möglich (Uchiyama et al. 2003b), da weniger Sequenzhomologien in den V_H -Regionen zu einem unzureichenden Primer-Annealing führen (Aubin et al. 1995, Segal 1996, Derksen et al. 1999).

Somatische Hypermutationen können auch im Bereich der J_H -Gene nachgewiesen werden (Linke et al. 1995a, Födinger et al. 1999). Dort erschweren sie ebenso wie Deletionen im Bereich der D_H - J_H -Junktion das Primerannealing. Je stringenter die PCR-Bedingungen sein müssen, desto bedeutsamer ist die J_H -Primer-Homologie zur Target-Sequenz (Donovan et al. 2000).

Bei einer Aufschlüsselung nach morphologischen Varianten bzw. Subtypen innerhalb der hier untersuchten Gruppe der DLBCL zeigte sich ebenfalls eine erhebliche Varianz der Detektionsrate von 25% bei anaplastischen NHL bis 100% bei immunoblastischen NHL. In der Gruppe der zentroblastischen NHL, die mit 35 Fällen im untersuchten Kollektiv die Mehrheit ausmachte, konnte in 63% ein monoklonales PCR-/Genescan-Signal detektiert werden. Das auffallend schlechte Ergebnis bei anaplastischen NHL ist darauf zurückzuführen, dass es sich dabei immunphänotypisch in der Regel um T- bzw. Null-Zelltypen handelt, bei denen selten ein IgH-Rearrangement vorliegt. Immunoblastische wie auch lymphoblastische NHL leiten sich im Gegensatz zu zentroblastischen NHL von Keimzentrums-naiven (pre-GC-) B-Zellen ab, die, nach den obigen Ausführungen, unmutierte V_H-Gene exprimieren und deshalb eine höhere PCR-Detektionsrate aufweisen.

Da es sich bei NHL primär um eine Lymphknotenerkrankung handelt, liegt es nahe, bei der Klonalitätsanalyse vorzugsweise auf diagnostisches Lymphknotenmaterial zurückzugreifen. Die Erfahrungen im Rahmen dieser Arbeit belegen die Schwierigkeiten, u.a. aus logistischen Gründen ausreichendes diagnostisches Primärmaterial zu erhalten, so dass, wie auch in anderen Studien, in einem Großteil der Fälle auf KM und/oder PB zum Zeitpunkt der Diagnose bzw. des Rezidives zurückgegriffen werden musste (Wu et al. 1997a und b, Vose et al. 2002). Eine Lymphknotenexstirpation wie auch eine Knochenmarkbiopsie erfolgten gewöhnlich nur zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder beim Verdacht auf das Vorliegen eines Rezidivs, so dass beim Verlaufsmonitoring in erster Linie auf das leichter zugängliche PB zurückgegriffen wurde.

Lymphomzellen sind zirkulatorische Zellen. Dementsprechend wies in der vorliegenden Untersuchung die Detektionsrate für monoklonale B-Zellen in den verschiedenen Kompartimenten erhebliche Unterschiede auf. Während im diagnostischen Tumormaterial (LK, Liquor, Pleuraerguß) in 89% eine klonale Lymphomzellpopulation nachgewiesen werden konnte, lag die Detektionsrate im KM und PB bei 65% bzw. 67%.

Diese Unterschiede sind vor allem auf die Interferenz beigemischter polyklonaler B-Zellen zurückzuführen. Die Amplifikationseffizienz der PCR wird durch die Konkurrenz um PCR-Primer und Nukleotide gesenkt (Chen et al. 1994). Die Spezifität der Reaktion nimmt ab, da unter Umständen die IgH-Konsensus-Primer gegenüber einigen IgH-Rearrangements normaler B-Zellen eine höhere Komplementarität aufweisen und diese dann präferentiell

amplifiziert werden, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (van Belzen et al. 1997, Rockman 1997, Corradini 1999, Zhou et al. 1999). Weiterhin sinkt die Sensitivität der IgH-CDR3-PCR bei einer zunehmenden Verdünnung in polyklonalen B-Zellen um 1-5% (Diss et al. 1993).

Demzufolge liegt die Detektionsrate im LK-Gewebe zwar höher, jedoch immer noch unter 100%, was sowohl auf die Beimischung polyklonaler B-Zellen auch in diesem Kompartiment als auch auf eine unterschiedliche Infiltration (diffus oder fokal) und infolgedessen auf einen „sampling error“ zurückgeführt werden kann. Mit einer Kombination aus FR1-, FR3- und Ig-Kappa-deleting element-Primern konnten Mitterbauer-Hohendanner et al. bei der Analyse von diagnostischem Lymphomgewebe von 155 Patienten mit einem DLBCL in 79% einen PCR-positiven Nachweis führen. Im Vergleich dazu lag die Detektionsrate im KM und PB jedoch nur bei 12% (Mitterbauer-Hohendanner et al. 2004). Jacquy et al. konnten mit der IgH-FR3-PCR bei 37 Patienten mit einem DLCL nur in 48% im LK-Gewebe eine monoklonale Lymphomzellpopulation nachweisen. Nach Kombination mit einem IgH-FR1-PCR-Assay konnte die Detektionsrate auf 60% gesteigert werden (Jacquy et al. 2000).

Die Konkordanz der Resultate der histomorphologischen Untersuchung mit den Ergebnissen der PCR-Klonalitätsanalyse liegt bei NHL nur bei ca. 60%. Am niedrigsten ist sie in der Gruppe der DLBCL (Coad et al. 1997, Kang et al. 2002). Problematisch ist unter Umständen die Abgrenzung zwischen benignen lymphoiden Clustern im KM, die sich bei ca. 9% aller Patienten, die im Rahmen eines Lymphomstaging eine Knochenmarkpunktion erhalten haben, morphologisch nachweisen lassen (Kremer et al. 2000) und einer malignen Knochenmarkinfiltration. Der Wert immunhistochemischer Untersuchungen ist wegen des limitierten Antikörper-Panels oftmals limitiert (Pittaluggo et al. 1999). In diesem Fall können die Durchflußzytometrie oder die PCR ergänzend zum Nachweis der Klonalität eingesetzt werden. Ein Vergleich der PCR-Produkte aus dem KM mit denen aus dem diagnostischen LK-Gewebe sollte daher, wenn möglich, immer erfolgen (Kremer et al. 2000, Ilgenfritz et al. 2009).

Ein anschauliches Beispiel für den praktischen Stellenwert der molekularen Klonalitätsdiagnostik im Rahmen der initialen Ausbreitungsdiagnostik bietet der Fall des Patienten P36, bei dem 03/95 die Erstdiagnose eines centroblastischen B-NHL mit einem Befall beidseits cervical sowie mediastinal entsprechend einem klinisch-radiologischen

Stadium II A gestellt worden war. Molekulargenetisch ließ sich mit der IgH-CDR3-Konsensus-PCR und der Genescan-Fragmentanalyse im morphologisch unauffälligen KM und PB eine monoklonale Lymphomzellpopulation mit einer Fragmentlänge von 144 bp vor einem Hintergrund polyklonaler B-Zellen nachweisen. Dies spricht im Gegensatz zum Ergebnis des klinisch-radiologischen Initialstaging für eine systemische Manifestation der Erkrankung. Nachdem mittels einer primären Chemotherapie (6 Zyklen CHOP) zunächst eine komplette klinische Remission der Erkrankung erreicht worden war, entwickelte der Patient zwei Jahre später, 04/1997, ein Rezidiv seines Lymphoms. Im Rezidiv-Lymphknotengewebe ließ sich mittels Genescanning derselbe Klon mit einer Fragmentlänge von 144 bp nachweisen. Nach seiner unvollständigen Eradikation durch die Primärtherapie war dieser residuelle Lymphomzellklon der Ausgangspunkt für das Rezidiv geworden.

Die klinische Relevanz eines sogenannten molekularen Stagings mit Hilfe der PCR-Klonalitätsanalyse ist weiterhin unklar, da hinsichtlich dieser Frage überwiegend indolente Lymphome, v.a. folliculäre Lymphome mit Hilfe der t(14;18)-PCR analysiert wurden. In den meisten dieser Studien hatte ein positiver PCR-Nachweis im KM oder PB bei Diagnosestellung keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Kang et al. 2002).

Im hier untersuchten Kollektiv hätte das Ergebnis der molekularen Klonalitätsanalyse bei insgesamt 6/45 Patienten (13%) ein sogenanntes „upstaging“ von einem klinisch-radiologisch gesicherten lokalisierten Stadium I oder II in ein fortgeschrittenes (molekulares) Stadium IV zur Folge gehabt. Mitterbauer-Hohendanner et al. konnten in ihrer Untersuchung an 155 Patienten mit einem DLBCL zeigen, dass der molekulargenetische Befund mittels IgH-PCR zusammen mit dem histomorphologischen Befund die Definition von drei Prognosegruppen mit einer unterschiedlichen 5-Jahres-Überlebensrate erlaubt. Während diese bei negativer KM-Histologie und negativem PCR-Nachweis in PB oder KM bei 66% lag, betrug sie bei positiver KM-Histologie und positivem PCR-Ergebnis lediglich 12%. Bei negativer KM-Histologie und positivem PCR-Resultat (21/130 Fällen, 16%) lag das 5-Jahres-Überleben bei 37%, d.h. für diese 21 Patienten hätte die durch die molekulare Analyse verbesserte initiale Ausbreitungsdiagnostik ein „upstaging“ bedeutet und damit verbunden mit 29% Unterschied im 5-Jahres-Überleben eine erhebliche prognostische Relevanz gehabt (Mitterbauer-Hohendanner et al. 2004). In der Arbeit von Hoshino et al. war der PCR-Nachweis einer DLBCL-Beteiligung von KM und/oder PB bei Diagnose mit einer deutlich erhöhten Rezidivrate assoziiert (Hoshino et al. 2004).

Ein großes Problem ist die fehlende Standardisierung der PCR-Methoden und die dadurch bedingte unzureichende Vergleichbarkeit der von verschiedenen Arbeitsgruppen erhaltenen Resultate. Die Untersuchung der Proben Homburg 1-6 in der vorliegenden Arbeit erfolgte im Rahmen eines Ringversuches, an dem neben unserem Labor auch Arbeitsgruppen aus Homburg und Ulm teilnahmen. In diesen Fällen wurde bei der Klonalitätsanalyse aus dem diagnostischen Primärmaterial (LK) eine gute Übereinstimmung der Resultate erzielt. Die Ergebnisse anderer, größerer Ringversuche haben die Notwendigkeit gemeinsamer Qualitätskontrollen eindrücklich belegt. So zeigte sich hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität der eingesetzten konventionellen PCR-Assays eine ausgeprägte Heterogenität (Johnson et al. 1999, Bagg et al. 2002), die die Einsatzmöglichkeiten dieser Techniken im Rahmen größerer, multizentrischer Studien erheblich limitiert. So betrug die Rate an falsch-positiven Ergebnissen in der Arbeit von Johnson et al. 28%. Die Ergebnisse einer ähnlich konzipierten Studie mit Real-time-PCR-Assays (siehe unten) zum Nachweis der t(14;18) zeigten akkuratere und reproduzierbare Ergebnisse, wenngleich aber auch keine absolute Spezifität (Darby et al. 2002)

Die Sequenzierung ist, da nur sie die einwandfreie Identifizierung klonspezifischer Sequenzen ermöglicht, unabdingbar zur Etablierung eines validen Verfahrens zur Detektion von MRD. Da der Größenbereich der IgH-CDR3-PCR-Produkte limitiert ist, ist der Nachweis längenidentischer Genrearrangements allein kein Beweis für eine Klonalität (Inghirami et al. 1993, Zhou et al. 1999, Lee et al. 2016).

In Abhängigkeit vom Ergebnis der Genescan-Fragmentanalyse wurden drei unterschiedliche Strategien zur Sequenzierung angewendet: 1) die direkte Sequenzierung fluoreszenzfarbstoffmarkierter PCR-Produkte, 2) die direkte Sequenzierung von Eluaten aus einem präparativen TGGE-Gel und 3) die Sequenzierung nach PCR-Klonierung.

Das direkte Einbringen von fluoreszenzfarbstoffmarkierten PCR-Produkten in die Cycle-Sequencing-Reaktion und die anschließende Sequenzierung in einem automatischen Sequenziergerät stellt eine zuverlässige und schnelle Methode zur Analyse der junktionalen Regionen dar (Kneba et al. 1995, Rothaupt 1995, Droese 2000). In einigen Fällen wird jedoch die Aussagekraft der direkten Sequenzierung durch das Auftreten überlagerter Sequenzen eingeschränkt (Linke 1997b).

Bei nicht eindeutig monoklonalen Rearrangements im Genescanbild oder nach erfolgloser direkter Sequenzierung wurden die PCR-Produkte kloniert und die Klone in die Cycle-Sequencing-Reaktion eingebracht. Da dies jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurde in einigen Fällen der Versuch unternommen, die TGGE als präparative Methode zu nutzen, da sie bis zu einem gewissen Maße die Trennung monoklonaler Fragmente von einem polyklonalen Hintergrund erlaubt (Linke et al. 1995a, Linke 1997b, Wu et al. 1997b). Beim Herauspräparieren derartiger Banden ist eine absolute Abtrennung von koamplifizierten PCR-Produkten reaktiver B-Zellen allerdings nicht möglich.

Von den genannten Verfahren bietet die Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli* mit nachfolgender Sequenzierung für die Klonalitätsanalyse von Immungen-PCR-Produkten mit einer Fehlerquote von 0,2% die relativ größte Sicherheit (Linke 1997b). Die Identifikation von zwei oder mehr sequenzidentischen Klonen im PCR-Produkt wurde als Klonalitätsmerkmal herangezogen (Linke 1997b). Die Identifikation intraklonaler Mikroheterogenitäten ist ausschließlich auf diesem Wege möglich (Linke 1997a und b, van Belzen et al. 1997).

Ein Vergleich der gewonnenen Sequenzdaten mit vorbekannten Nukleotidsequenzen von D_H - und J_H -Keimbahnsequenzen (Ravetch et al. 1981, Sanz 1991, Elgavesh und Schröder 1993, Mattila et al. 1995, Tomlinson et al. 1995, Linke 1997b) erlaubte in allen Fällen die Zuordnung von J_H -Elementen. In zwei Fällen (P20, P25) konnte kein D_H -Segment und damit auch keine spezielle Bruchpunktregionen identifiziert werden. D_H -Elemente stellen eine sehr heterogene Gruppe dar. Ihre Identifikation bereitet bekanntermaßen große Probleme, da sie fehlen, nur partiell oder in umgekehrter Orientierung Teil eines Rearrangements sein können (Sanz 1991).

Ein Vergleich von Sequenzdaten zeigte in den beiden Fällen, in denen sowohl eine direkte Sequenzierung nach einer präparativen TGGE als auch eine PCR-Klonierung durchgeführt worden waren (P17a, P44), eine sehr gute Übereinstimmung.

Bei dem Patienten P17a fanden sich neben der klonspezifischen Sequenz weiterhin zwei sequenzidentische Plasmide, deren Sequenz mit der der Probe P17b desselben Patienten übereinstimmte. Dabei handelte es sich um einen sekundären Klon, der zum Zeitpunkt des Todes des Patienten das präferentielle Rearrangement darstellte und bereits 7 Monate früher,

zum Zeitpunkt des Rezidivs, gleichermaßen maskiert im Hintergrund beigemischter polyklonaler B-Zellen nachweisbar war. Diese polyklonalen Amplifikate waren durch die TGGE von den monoklonalen Fragmenten getrennt worden, so dass mit dieser Methode nur der in der Genescananalyse nachgewiesene Klon präferentiell sequenziert wurde. Aarts et al. beschrieben den ähnlichen Fall eines Patienten mit einem folliculären Lymphom, bei dem umfangreiche Sequenzanalysen retrospektiv den Nachweis erbrachten, dass der Klon, der zum Zeitpunkt des Rezidivs dominierte, in sehr geringer Ausprägung bereits in der primärdiagnostischen Lymphomgewebeprobe existent gewesen und im weiteren Verlauf herausselektiert worden war („selective outgrowth of minor subclones“, Aarts et al. 2001). Im Hinblick auf derart detaillierte Sequenzanalysen bei Lymphomen ist, wie hier gezeigt, die PCR-Klonierung die überlegene Methode. Aus Gründen der Praktikabilität sollte auf dieses langwierige, arbeitsintensive Verfahren jedoch nur in Problemfällen zurückgegriffen werden und ansonsten die direkte Sequenzierung, ggf. nach einer präparativen TGGE, angestrebt werden.

Die bisher diskutierten Arbeitsschritte dienten der molekularen Charakterisierung der spezifischen Rearrangements anhand der diagnostischen Gewebeproben der Patienten und bildeten damit die Grundlage für den nachfolgenden Einsatz klonspezifischer Oligonukleotide zum semiquantitativen Nachweis residueller Lymphomzellen in Verlaufspröben der Patienten.

Die Analyse der klonspezifischen N-Regionen der unterschiedlichen Rearrangements erfolgte im Hinblick auf ihre Eignung für die Konstruktion von allelspezifischen PCR-Primern. Die Variabilität der N-Region und damit die Spezifität der allelspezifischen PCR werden in einem erheblichen Maße bestimmt von der Größe und der Sequenz der $V_H-N_1-D_H-N_2-J_H$ -Region, den variablen Bruchpunkten in den flankierenden V_H -, D_H - und J_H -Segmenten sowie dem Verhältnis des Anteils eines D_H -Segmentes zur Anzahl der N-Nukleotide. Aufgrund der höheren Sequenzstabilität sollte für die Konstruktion des allelspezifischen Primers der Bereich der $D_H-N_2-J_H$ -Verknüpfung als Matrix dienen (Linke 1997b). Mindestens eine der beiden Bruchpunktregionen sollte von dem N-Primer erfasst werden. Sequenzanalysen zeigen, dass im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten, ALL- oder MM-Zellen die N-Regionen bei B-NHL in der Regel kürzer sind (van Belzen et al. 1997). Die Diversität im junktionalen Bereich ist bei kurzen N-Regionen oder bei ihrem Fehlen erheblich reduziert (Voena et al. 1997). Es bleibt dann nur wenig Spielraum für die Positionierung des

allelspezifischen Primers. Je größer die daraus resultierende Überlappung mit Keimbahnsequenzen ist, desto höher ist das Risiko der Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte mit einer partiellen Sequenzhomologie (Beaubier et al. 2000). Im Zweifelsfall ist deshalb die Position des Primers höher zu bewerten als andere ansonsten beim Primerdesign zu berücksichtigende Faktoren wie Länge, Sekundärstrukturen, Schmelztemperatur und Dimerbildung (Droese 2000).

Die Überprüfung der Spezifität des klon-spezifischen Primers erfolgte durch eine parallele N-PCR-Reaktion an der diagnostischen Probe sowie an einer polyklonalen Kontrolle. Durch eine Variation der Reaktionsbedingungen, vor allem eine Erhöhung der Annealing-Temperatur, konnte bei einer unzureichenden Spezifität eine Optimierung versucht werden. Danach konnten 7/10 der klon-spezifischen Oligonukleotide als „spezifisch bindend“ eingeordnet werden. In 2/3 Fällen mit unspezifisch bindenden N-Primern (P31, P44) bestand die Primermatrix lediglich aus der N-Region und schloss keine Bruchpunktregion mit ein, was einen Verlust an Spezifität bedeutet (Pongers-Willemse et al. 1998 a und b).

Zur Quantifizierung residueller Lymphomzellen wurden die Verlaufsmaterialien eines Patienten in einem semiquantitativen Verfahren auf eine Verdünnungsreihe des primärdiagnostischen Materials bezogen. Das Primärmaterial wurde ausgehend von 1 µg in Zehnerschritten $1:10^{-1}$ bis $1:10^{-6}$ in aqua bidest. verdünnt. Im Gegensatz zur Verdünnung in polyklonaler DNA, bei der es zu einer Konkurrenz normaler B-Zellen um PCR-Reagentien kommt, führt dies zu einer präferentiellen Amplifikation des spezifischen Produktes und damit scheinbar zu einer höheren Sensitivität der N-PCR. (Inghirami et al. 1993, de Re et al. 1995). Die Sensitivität der verschiedenen klon-spezifischen PCR-Assays schwankte zwischen 10^{-3} und 10^{-5} . Diese schwankende Sensitivität der N-PCR-Assays wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Zwicky et al. 1996, van Belzien et al. 1997, Blystad et al. 2004) und ist u.a. auf die Heterogenität der einzelnen CDR3-Regionen sowie auf unterschiedliche Target-DNA-Konzentrationen zurückzuführen (Yokohama et al. 2001)

Wie die vorherigen Ausführungen deutlich machen, ist die molekulare Charakterisierung von DLCBL besonders schwierig und zeitaufwendig, vor allem bei (semi-) quantitativen Analysen. Dies mag der Grund dafür sein, dass es bislang im Gegensatz zu follikulären oder Mantelzell-Lymphomen nur wenige Daten zur MRD-Diagnostik bei DLBCL gibt

(Hardingham et al 1995, Zwicky et al. 1996, van Belzen et al. 1997, Scholten et al. 1997, Kanteti et al 1999, Jacquy et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnten bei 5/6 Patienten bis zu 36 Monate nach Abschluss der konventionellen Chemotherapie mittels klonspezifischer PCR residuelle Lymphomzellen nachgewiesen werden. 2/6 Patienten verstarben, ohne überhaupt eine Remission erreicht zu haben (P17, P28). In diesen Fällen war die anhaltende PCR-Positivität mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert. In diesen Fällen war die anhaltende PCR-Positivität mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert.

In zwei weiteren Fällen (P10 und P39) konnte hingegen keine Korrelation des klinischen mit dem molekulargenetischen Verlauf belegt werden, denn trotz des anhaltenden molekulargenetischen Nachweises residueller Lymphomzellen befanden sich beide Patienten zwei (P10) bzw. fünf Jahre (P39) nach Abschluss der Therapie in einer anhaltenden klinischen kompletten Remission. In beiden Fällen betrug die Sensitivität des N-PCR-Assays 10^{-5} .

Nur die Patientin P22 mit einem Burkitt-Lymphom wurde bereits nach zwei Zyklen einer im Vergleich deutlich dosisintensiveren Polychemotherapie MRD-negativ und befand sich danach in einer anhaltenden klinischen und molekularen Remission (Stand 05/04).

Ein Vergleich dieser Daten mit den bereits in der Literatur publizierten gestaltet sich aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen handelt es sich dabei in der Regel um sehr heterogene Patientenkollektive. Aufgrund der Anwendung verschiedener Lymphom-Klassifikationen wurden oft folliculäre Lymphome WHO Grad 3 oder sekundär hochmaligne transformierte folliculäre Lymphome der Gruppe der aggressiven Lymphome zugeordnet. Dies mag der Grund dafür sein, warum ein überdurchschnittlich großer Anteil der dabei untersuchten Lymphome eine t(14;18) als molekularen Marker aufwies, denn ohne histologische Hinweise auf ein präexistentes oder primär-simultanes folliculäres Lymphom wurde bei DLBCL nur in maximal 8-13% der Fälle eine t(14;18) nachgewiesen (Evans et al. 2007). Folglich wurde in der Regel zum Nachweis von MRD anstelle des IgH-Rearrangements die spezifischere t(14;18) als molekularer Marker genutzt, die zudem im Vergleich eine höhere Sensitivität aufweist. Weiterhin erfolgten die meisten Untersuchungen im Kontext von Hochdosistherapien mit einer nachfolgenden autologen KMT/PBSCT.

Untersuchungen zum Nachweis von MRD bei DLBCL im Rahmen konventioneller Therapien liegen praktisch nicht vor (van Belzen et al. 1997, Hoshino et al. 2004).

Wie in der vorliegenden Arbeit beobachteten van Belzen et al. beim MRD-Monitoring von zwei Patienten mit einem DLBCL mit der klonspezifischen PCR eine Persistenz residueller Lymphomzellen im PB und KM nach einer primären Chemotherapie bzw. nach einer primären autologen PBSCT bei klinischer kompletter Remission. Im Verlauf erlitten beide Patienten ein nodales Rezidiv. Erst nach einer neuerlichen Chemotherapie wurde eine klinische komplette und molekulare Remission erreicht (van Belzen et al. 1997). Hoshino et al. konnten zeigen, dass der PCR- Nachweis residueller Lymphomzellen im peripheren Blut und Knochenmark nach einer konventionellen Chemotherapie bei Patienten mit einem DLBCL mit einem verkürztem progressionsfreien- und Gesamtüberleben assoziiert ist. (Hoshino et al. 2004). Der Nachweis residueller Lymphomzellen im Knochenmark vor einer Stammzellapherese ist prognostisch ungünstig (Sharp et al. 1996). In der Mehrzahl der Studien zeigte sich bei PCR-negativen Grafts eine höhere Rate an kompletten Remissionen und ein besseres progressionsfreies- und Gesamtüberleben (Kanteti et al. 1999, Jacquy et al. 2000, Vose et al. 2001). Übereinstimmung bestand darin, dass ein anhaltend positiver PCR-Nachweis nach einer SCT mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergeht (Zwicky et al. 1996, Miglino et al. 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin zwei Patienten mit einem indolenten B-NHL untersucht, bei denen im Verlauf der Behandlung eine Hochdosistherapie mit nachfolgender autologer peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSCT) durchgeführt wurde (P10, P 26). In beiden Fällen konnte unmittelbar vor der autologen PBSCT ein positiver MRD-Nachweis im peripheren Blut geführt werden. Selbst mit einer kombinierten Hochdosistherapie (Ganzkörperirradiation und myeloablative Chemotherapie) war somit keine Eradikation des malignen Klons erreicht worden.

Der Patient P10 befand sich zwei Jahre nach der PBSCT in klinischer kompletter Remission; der weitere Verlauf ist leider nicht bekannt.

Im Fall des Patienten P26 waren die untersuchten Proben aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut mit Ausnahme einer Probe (PB, 10 Tage nach PBSCT) sowohl unmittelbar vor als auch nach der PBSCT allesamt PCR-positiv, d.h. ein systemischer Befall blieb auf

molekularer Ebene anhaltend nachweisbar. Wahrscheinlich lag bei der einzigen PCR-negativen Probe der Tumorzellgehalt unmittelbar unterhalb der Nachweisgrenze von 10^{-3} . In der Genescan-Analyse konnte über einen Zeitraum von 18 Monate eine stetige Zunahme der Fluoreszenzintensität, entsprechend einer Zunahme des Tumorzellklons, beobachtet werden. Bemerkenswert ist, dass es dennoch erst fünf Jahre nach der PBSCT zu einem ersten Lokalrezidiv kam, gefolgt von einem weiteren lokalen Rezidiv weitere dreieinhalb Jahre später.

Weitgehende Einigkeit besteht darüber, dass das Unvermögen, bei Patienten mit einem indolenten NHL nach einer autologen SCT eine molekulare Remission zu erreichen und zu erhalten, prädiktiv ist für ein nachfolgendes Rezidiv (Gribben et al. 1993, Hardingham et al. 1995, Corradini et al. 1997, Hirt et al. 2000, Magni et al. 2000). Eine anhaltende PCR-Negativität ist der wichtigste Prädiktor für ein längeres rezidivfreies Überleben (Gribben et al. 1993, Corradini et al. 2004, Pott et al. 2006, Geisler et al. 2008). Die Konversion von einem MRD-negativen in einen MRD-positiven Status nach einer autologen SCT korreliert mit einem erheblich gesteigerten Rezidivrisiko (Pott et al. 2006). Von besonderer Bedeutung ist dabei die quantitative Analyse der MRD. Bei einer anhaltenden klinischen kompletten Remission bleiben die MRD-Level innerhalb einer log-Stufe stabil, während im Falle einer klinischen Rezidivs auf molekularer Ebene ein Anstieg des MRD-Levels um mehrere log-Stufen bis über 12 Monate nachgewiesen werden konnte (Hirt et al. 2000).

Das Ziel des Ende der 90er Jahre initiierten BIOMED-2-Projektes war eine Verbesserung der PCR-Assays zur Steigerung der Detektionsrate bei der molekularen Klonalitätsanalyse von Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Genrearrangements sowie ihre weitgehende Standardisierung, um so eine bessere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse zu gewährleisten. (van Krieken et al. 2003, van Dongen et al. 2003). Im Vergleich mit den etablierten Konsensus-Primern konnte nun mit einer Kombination von bis zu acht Multiplex-PCR-Assays (IgH FR1-3, IgKappa/IgLambda, inkomplette DH-JH-Rearrangements) die Detektionsrate für NHL vom GC/post-GC-Typ trotz der hohen Rate an somatischen Hypermutationen erheblich gesteigert werden und liegt jetzt auch für DLBCL bei deutlich über 90% (Catherwood et al. 2007, Evans et al. 2007). Die Rate an falsch-negativen Ergebnissen wird mit 1-6% beziffert, falsch-positive Ergebnisse im Sinne des Nachweises einer Pseudoklonalität treten noch in bis zu 7% auf (Evans et al. 2007). In mehreren prospektiven Studien zum Einsatz der BIOMED-2-PCR-Assays wurden diese

Ergebnisse nicht nur weitgehend reproduziert (van Krieken et al. 2007, Liu et al. 2007), sondern es konnte auch eine aus praktischen und ökonomischen Gründen notwendige Reduktion der Anzahl der eingesetzten Assays im Sinne eines stufenweisen analytischen Vorgehens vorgenommen werden (van Krieken et al. 2007, Liu et al. 2007).

Während sich somit die Klonalitätsdiagnostik für DLBCL aufgrund der dargestellten technischen Neuerungen deutlich verbessert hat, ist der Stellenwert der MRD-Diagnostik für die DLBCL im Vergleich mit anderen Lymphomentitäten weiterhin fraglich. Dies beruht nicht zuletzt auch auf prinzipiellen bzw. konzeptionellen Problemen.

Im Gegensatz zu den bekannten prätherapeutischen und infolgedessen eher statischen Prognosefaktoren des IPI oder den Genexpressionsanalysen (GEP) bietet die MRD-Diagnostik den Vorteil, die Dynamik einer Erkrankung und das therapeutische Ansprechen, das weiterhin den wichtigsten prognostischen Faktor darstellt, weitaus besser abzubilden. Das Ziel der MRD-Diagnostik sollte es sein, möglichst früh diejenigen Hochrisiko-Patienten zu identifizieren, die primär nicht auf eine Behandlung ansprechen oder die ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen, um so die Möglichkeit einer frühzeitigen Therapieintensivierung bzw. einer präemptiven Behandlung in einer klinischen Situation mit einer noch möglichst geringen Tumorlast zu haben, wie dies bereits für Patienten mit einer Vorläufer B- oder einer T-ALL der Fall ist (Cave et al. 1998, van Dongen et al. 1998).

Mit der „Real-Time“-RQ-PCR wurde ein neues Verfahren für serielle quantitative Verlaufsuntersuchungen an Patienten mit Leukämien und Lymphomen etabliert (Dölken et al. 1998, Pongers-Willemse et al. 1998b, Brüggemann et al. 2000, Donovan et al. 2000). Im Gegensatz zur Endpunktanalyse bei den verschiedenen Methoden der quantitativen PCR-Assays („limiting dilution“, kompetitive PCR) erfolgt die Quantifizierung hier durch die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, das durch eine intern zu den PCR-Primern gelegene Sonde während der spezifischen PCR-Amplifikation freigesetzt wird, und zwar nicht in der Plateauphase, sondern direkt während der linearen Phase der PCR (Heid et al. 1996). Die Spezifität und Sensitivität der Reaktion wird auf diese Weise erheblich gesteigert, das Risiko einer Kontamination durch den Wegfall des post-PCR-Prozessing deutlich minimiert. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse liegt damit deutlich höher als bei den weitaus störanfälligeren, arbeitsintensiven herkömmlichen quantitativen PCR-Assays. Eine bessere Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten erscheint somit möglich. Ein weiterer Vorteil

dieser „online“-Fluoreszenzdetektion ist es, dass die MRD-Diagnostik mit einer definierten Empfindlichkeit zeitnah zu den klinischen Kontrollen erfolgen kann, damit ein solcher Nachweis eine unmittelbare Konsequenz im Sinne einer Therapiemodifizierung bzw. –optimierung und Prognoseverbesserung haben kann.

Im Rahmen der MRD-Diagnostik kam die RQ-PCR bislang weiterhin bei Patienten mit einem indolenten Lymphom (FL, CLL, MCL) oder einem Multiplen Myelom zum Einsatz (Pongers-Willemsse et al. 1998b, Donovan et al. 2000, Dölken et al. 1998, Ladetto et al. 2001, Mandigers et al. 2001a und b). Methodische Probleme, wie sie oben für die konventionelle allelspezifische PCR erörtert wurden, standen dem breiteren Einsatz der RQ-PCR zur MRD-Diagnostik bei den B-NHL, die über keine Chromosomentranslokation als molekularen Marker verfügen, d.h. vor allem bei den DLBCL, bislang jedoch entgegen (Yashima et al. 2003, Blystad et al. 2004). Darüber hinaus sind für die Behandlung von DLBCL im Gegensatz zu den ALL weder prädiktive MRD-Schwellenwerte zur Risikostratifikation noch die spezifischen Zeitpunkte für ihre Ermittlung definiert.

Vielleicht bieten neue Sequenzierungsstrategien wie das „Next Generation Sequencing“ einen Ansatz, einen Teil der genannten methodischen Hindernisse zu umgehen, wie erste Untersuchungen bei der Verlaufsbeurteilung von DLBCL-Proben es annehmen lassen (Kurtz et al. 2015, Roschewski et al. 2015). In der Arbeit von Roschewski et al. wurden bei 87% der Patienten prätherapeutisch im diagnostischen Material sowie im peripheren Blut klonotypische B-Zellen detektiert. Ihr residueller Nachweis nach 2 Zyklen einer Immun-/Chemotherapie korrelierte mit dem 5-Jahres-progressionsfreien Überleben (42% bei Biomarker-Positivität gegenüber 80% bei Biomarker-Negativität). Bei den 25 Patienten, die ein frühzeitig relabierten, war es zuvor zu keiner Clearance von Lymphomzellen gekommen. 10/11 Patienten mit einem Spätrezidiv wiesen eine Konversion von einem Biomarker-positiven in einen Biomarker-negativen Status auf. Dieses molekulare Rezidiv trat dabei im Median 3,5 Monate vor dem klinischen Rückfall auf (Roschewski et al. 2015).

Ein weiteres Problem ist das differentielle Ansprechen von Lymphomen in den verschiedenen Kompartimenten Lymphknoten, Knochenmark und peripheres Blut (Rockman 1997). Der MRD-Nachweis spiegelt nur die residuelle Tumorzelllast in dem jeweils untersuchten Kompartiment wider, d.h., die Ergebnisse der Analysen in den verschiedenen Kompartimenten müssen nicht unbedingt konkordant sein. Trotz eines molekulargenetisch

negativen Nachweises residueller Lymphomzellen im peripheren Blut oder Knochenmark ist bisweilen weiterhin ein nodaler Befall nachweisbar („nodal PR“, Ghielmini et al. 2000, Rambaldi et al. 2002). Im peripheren Blut sind residuelle Lymphomzellen anscheinend für eine Komplement- oder für eine NK-Zell-medierte Zytolyse besser zugänglich als im Knochenmark (Rambaldi et al. 2002). Unter einer Rituximab-Monotherapie steigt beispielsweise bei Patienten mit einem MCL oder FL im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie mit CHOP die Clearance-Rate im peripheren Blut von 35% auf 59%, im Knochenmark bleibt sie hingegen nahezu unverändert (39% versus 36%). Eine Analyse des peripheren Bluts allein ist somit für ein MRD-Monitoring zu ungenau und prognostisch nicht aussagekräftig (Howard et al. 2002), während das molekulare Ansprechen im Knochenmark als Prädiktor für das klinische Ansprechen verlässlicher erscheint (Rambaldi et al. 2005).

Es wird immer deutlicher, dass für eine substantielle Verbesserung der Therapieergebnisse in der Behandlung von Patienten mit einem DLBCL die rationale Patientenselektion von massgeblicher Bedeutung sein wird (Sehn 2012).

Diskutiert werden müssten beispielsweise folgende klinische Szenarien, in denen das Ergebnis der MRD-Diagnostik eine unmittelbare (differential-) therapeutische Konsequenz haben könnte:

- die Reduktion oder gar der Verzicht auf eine Chemotherapie zugunsten einer Immuntherapie zur Toxizitätsminderung bei Niedrig-Risiko-Patienten,
- das Problem der Spät-Rezidive in limitierten Stadien,
- die Entwicklung dosisdichter bzw. dosisintensivierter Therapieregime für Hochrisiko-Patienten,
- die frühzeitige Therapieintensivierung bei Patienten, die auf die Induktions-Chemotherapie nur unzureichend angesprochen haben im Sinne einer risikoadaptierten Behandlung (Kasamon et al. 2009),
- die Definition von Risikogruppen, die nach dem primären Ansprechen auf eine konventionelle Therapie aufgrund eines hohen Rezidivrisikos am ehesten von einer primären Hochdosistherapie profitieren könnten und für die die Toxizität einer solchen Behandlung am ehesten vertretbar erscheint (Betticher et al. 2006),
- die Frage einer Erhaltungstherapie nach Erreichen einer Remission und die Möglichkeit einer präemptiven Therapie im Falle eines „molekularen Rezidivs“ zur

Remissionsreinduktion vor Entwicklung eines klinischen Rezidivs, wie dies bereits für Patienten mit einem MCL berichtet wurde (Andersen et al. 2002)

- und schliesslich die Evaluation neuer Therapiemodalitäten auf molekularer Ebene, wie beispielweise der Einsatz neuer monoklonaler Antikörper, immunmodulatorischer Behandlungsansätze oder zellulärer Immuntherapieverfahren.

Sofern die in dieser Arbeit diskutierten methodischen und konzeptionellen Probleme überwunden werden könnten, bestünde hierin der wesentliche klinische Ansatzpunkt einer MRD-Diagnostik bei Patienten mit einem DLBCL.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis klonal rearrangierter Immunglobulin-Schwerkettengene (IgH) mit Hilfe der IgH-CDR3-Konsensus-PCR, der Genescan-Fragmentanalyse und der nachfolgenden DNA-Sequenzanalyse für die molekulargenetische Charakterisierung von 49 Patienten mit einem aggressiven B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom etabliert. Anschließend wurden durch den Einsatz allelspezifischer Oligonukleotide in einem semiquantitativen Verfahren Verlaufsmaterialien von sechs Patienten auf das Vorhandensein residueller Lymphomzellen während und im Anschluss an eine Therapie hin untersucht.

Bei 45/49 (92%) Patienten stand für eine PCR geeignete DNA aus dem Primärmaterial für die IgH-CDR3-Konsensus-PCR zur Verfügung. In 20/45 Fällen (44%) konnte ein monoklonales PCR-Produkt nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Genescan-Fragmentanalyse konnte aufgrund der besonders guten Auflösung der relativ kleinen IgH-CDR3-PCR-Produkte im 6%-igen PAA-Gel die Detektionsrate um 23% auf 67% (30/45 Fälle) gesteigert werden.

Es zeigte sich bei der Analyse der Ergebnisse zum Teil eine signifikante Varianz der Detektionsraten für monoklonale B-Zellpopulationen in Abhängigkeit vom untersuchten Material (KM, PB, LK), vom histologischen Lymphom-Subtyp und vom klinischen Stadium der Erkrankung. Im diagnostischen Tumormaterial (LK, Liquor, Pleurapunktat) lag die Detektionsrate mit 89 % höchsten, im KM (65%) und PB (67%) hingegen deutlich niedriger. Bei einem Vergleich zwischen den verschiedenen Kompartimenten zeigte sich eine gute Konkordanz der Ergebnisse. In 6/45 Fällen konnten molekulargenetisch klonale Lymphomzellpopulationen nachgewiesen werden, die zuvor der zytologischen bzw. histomorphologischen Diagnose entgangen waren. Dies hätte ein „upstaging“ in ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium zur Folge gehabt. Bei einer Subgruppenanalyse der verschiedenen histologischen Subtypen bzw. Subentitäten wurde der niedrigste Anteil klonaler IgH-CDR3-Rearrangements mit 25% bei den anaplastischen Lymphomen, der höchste mit 100% bei den immunoblastischen Lymphomen gefunden. In der grössten Gruppe der zentroblastischen Lymphome lag die Detektionsrate bei 63%.

Zur Identifizierung der klonalspezifischen Sequenzen wurden die PCR-Produkte von neun ausgewählten Patienten sequenziert. War die direkte Sequenzierung von fluoreszenzfarbstoffmarkierten PCR-Produkten in einem automatischen Sequenziergerät nicht möglich, wurde entweder der Versuch einer direkten Sequenzierung von eluierten

Reamplifikaten aus einem präparativen TGGE-Gel unternommen oder auf eine PCR-Klonierung mittels Vektor in *E.coli* zurückgegriffen.

Mit Hilfe der junktionalen Sequenzdaten wurden zunächst von 9 Patienten 10 allelspezifische Oligonukleotide für den Nachweis residueller Lymphomzellen in einer patientenspezifischen „N-PCR“ konstruiert. Dabei wurden eine serieller Verdünnungsreihe der DNA des diagnostischen Materials und die Verlaufsproben des Patienten jeweils parallel analysiert. In der anschließenden Genescan-Analyse entsprach die Fläche unter dem spezifischen Produkt-„Peak“ der Menge des eingesetzten PCR-Produktes. Die Verdünnungsstufe, bis zu der sich ein spezifischer „Peak“ nachweisen ließ, entsprach der unteren Nachweisgrenze. 7/10 der klonspezifischen Oligonukleotide konnten als „spezifisch bindend“ eingeordnet werden. Anschliessend wurden 6 Patienten für die MRD-Analyse während und nach Abschluss der Therapie ausgewählt. Residuelle Lymphomzellen konnten bei 5/6 Patienten bis zu 36 Monate nach Abschluss der Therapie nachgewiesen werden. 2/6 Patienten verstarben, ohne überhaupt eine Remission erreicht zu haben. Zum Zeitpunkt des Abschlusses des experimentellen Teils dieser Arbeit befanden sich 4/6 Patienten trotz des molekulargenetischen Nachweises residueller Lymphomzellen weiterhin in klinischer Remission. Dazu gehörten auch zwei Patienten mit einem indolenten Lymphom, die einer Hochdosistherapie mit einer anschließenden autologen peripheren Blutstammzelltransplantation zugeführt worden waren. Die Sensitivität der verschiedenen klonspezifischen PCR-Assays schwankte zwischen 10^{-3} und 10^{-5} . Die IgH-CDR3-Region erwies sich dabei im Verlauf der Erkrankung als ein stabiler Marker. Bezogen auf das in dieser Arbeit untersuchte kleine Kollektiv hatte der Nachweis residueller Lymphomzellen sowohl während und nach einer konventionellen Chemotherapie wie auch nach einer Hochdosistherapie mit nachfolgender autologer PBSCT keine prognostische Relevanz.

Die Genescan-Fragmentanalyse fluoreszenzfarbstoffmarkierter IgH-Konsensus- und klonspezifischer PCR-Produkte erwies sich prinzipiell als hochempfindliches Verfahren zur molekularen Klonalitätsanalyse bei Erstdiagnose und zum Nachweis von MRD während und im Anschluss an eine Therapie. Methodische Probleme, die im Rahmen dieser Arbeit diskutiert wurden, stehen einer breiteren Anwendung zur zeitnahen Analyse grösserer Patientenkollektive jedoch noch entgegen. Nach wie vor lässt sich aus den vorliegenden spärlichen MRD-Daten bei Patienten mit einem DLBCL deshalb eine prognostische Relevanz nicht ableiten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aarts, W.M., Bende, R.J., Bossenbroek, J.G., Pals, S.T., van Noessel, C.J. (2001). Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: subclone selection rather than clonal evolution over time. *Blood*, 98(1), 238-240.

Achille, A., Scarpa, A., Montresor, M., Scardoni, M., Zamboni, G., Chilosi, M., Capelli, P., Franzan, G., Menestrina, F. (1995): Routine application of polymerase chain reaction in the diagnosis of monoclonality of B-cell lymphoid proliferations. *Diagn. Mol Pathol*, 4(1), 14-24.

Andersen, N.S., Donovan, J.W., Borus J.S., Poor, C.M., Neuberg, D., Aster, J.C., Nadler, L.M., Freedman, A.S., Gribben, J.G. (1997). Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood*, 90(10), 4212-4221.

Andersen, N.S., Donovan, J.W., Zuckerman, A., Pedersen, L., Geisler, C., Gribben, J.G. (2002). Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol*, 30, 703-710.

Arber, D.A. (2000). Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *J Mol Diagn*, 2(4), 178-190.

Aubin, J., Davi, F., Nguyen-Salomon, F., Leboeuf, D., Debert, C., Taher, M., Valensi, F., Canioni, D., Brousse, N., Varet, B., Flandrin, G., Macintyre, E.A. (1995). Description of a novel FR1 PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia*, 9, 471-479.

Ayling, J.F., Iland, H.J. (1999). High-resolution analysis of gene rearrangements in lymphoid malignancies. *Pathology*, 31, 252-256.

Bagg, A., Braziel, R.M., Arber, D.A., Bijwaard, K.E., Chu, A.Y. (2002). Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas. A multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn*, 4(2), 81-89.

Beaubier, N.T., Hart, A.P., Bartolo, C., Willman, C.L., Viswanatha, D.S. (2000). Comparison of capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of T and B cell clonality by polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol*, 9(3), 121-131.

van Belzen, N., Hupkes, P.E., Doekharan, D., Hoogeveen-Westerveld, M., Dorssers, L.C.J., van't Veer, M.B. (1997). Detection of minimal residual disease using rearranged immunoglobulin heavy chain genes from intermediate- and high-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 11, 1742-1752.

Berek, C., Berger, A., Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67(6), 1121-1129.

Betticher, D.C., Martinelli, G., Radford, J.A., Kaufmann, M., Dyer, M.J.S., Kaiser, U., Aulitzky, W.E., Beck, J., von Rohr, A., Kovascovics, T., Cogliatti, S.B., Cina, S., Maibach, R., Cerny, T., Linch, D.C. (2006). Sequential high dose chemotherapy as initial treatment for aggressive sub-types of Non-Hodgkin lymphoma: results of the international randomized phase III trial (MISTRAL). *Ann Oncol*, 17(10), 1546-1552.

Blystad, A.K., Delabie, J., Kvaloy, S., Holte, H., Valerhaugen, H., Ikonomou, I., Kvalheim, G. (2004). Infused CD34+ cell dose, but not tumour cell content of peripheral blood progenitor cell grafts, predicts clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3 treated with high-dose therapy. *Br J Haematol*, 125, 605-612.

Brüggemann, M., Droese, J., Bolz, I., Lüth, P., Pott, C., von Neuhoff, N., Scheuering, U., Kneba, M. (2000). Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leucemia*, 14, 1419-1425.

Camilleri-Broet, S., Deveze, F., Tissier, F., Ducruit, V., Le Tourneau, A., Diebold, J., Audouin, J., Molina, T. (2000). Quality control and sensitivity of polymerase chain reaction techniques for the assessment of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements from fixed-and paraffin-embedded samples. *Ann Diagn Pathol*, 4(2), 71-76.

Catherwood, M.A., Gonzalez, D., Patton, C., Dobbin, E., Venkatraman, L., Alexander, H.D. (2007). Improved clonality assessment in germinal centre/post germinal centre non-Hodgkin's lymphomas with rates of somatic hypermutation. *J Clin Pathol*, 60, 524-528.

Cave, H., van der Werff ten Bosch, J., Suci, S., Guidal, C., Waterkeyn, C., Otten, J., Bakkus, M., Thielemans, K., Grandchamp, B., Vilmer, E. (1998). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leucemia. *N Engl J Med*, 339(9), 591-598.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D.E., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1717-1723

Coad, J.E., Olson, D.J., Christensen, D.R., Lander, T.A., Chibbar, R., McGlennen, R., Brunning, R.D. (1997). Correlation of PCR-detected clonal gene rearrangements with bone marrow morphology in patients with B-lineage lymphomas. *Am J Surg Pathol*, 21(9), 1047-1056.

Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H. (2010). Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing Rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, 116 (12), 2040-2045

Colombat, P., Salles, G., Brousse, N., Eftekhan, P., Soubeyran, P., Delwail, V., Deconinck, E., Haioun, C., Foussard, C., Sebban, C., Stamatoullas, A., Milpied, N., Boue, F., Taillan, B., Lederlin, P., Najman, A., Thieblemont, C., Montestruc, F., Mathieu-Boue, A., Benzohra, A.,

Solal-Celigny, P. (2001). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*, 97 (1), 101-106.

Corradini, P., Astolfi, M., Cherasco, C., Ladetto, M., Voena, C., Caracciolo, D., Pileri, A., Tarella, C. (1997). Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood*, 89(2), 724-731.

Corradini, P., Ladetto, M., Pileri, A., Taralla, C. (1999). Clinical relevance of minimal residual disease monitoring in non-Hodgkin's lymphomas: a critical reappraisal of molecular strategies. *Leukemia*, 13, 1691-1695.

Corradini, P., Ladetto, M., Zallio, F., Astolfi, M., Rizzo, E., Sametti, S., Cuttica, A., Rosato, R., Farina, L., Boccadoro, M., Benedetti, F., Pileri, A., Tarella, C. (2004). Long-term follow-up of indolent lymphoma patients treated with high-dose sequential chemotherapy and autografting: evidence that durable molecular and clinical remission frequently can be attained only in follicular subtypes. *J Clin Oncol*, 22(8), 1460-1468.

Darby, A.J., Johnson, P.W.M. (2002). Molecular remission and non-Hodgkin's lymphoma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 15(3), 549-562.

Derksen, P.W.B., Langerak, A.W., Kerkhoff, E., Wolvers-Tettero, I.L.M., Boor, P.P.C., Mulder, A.H., Vrints, L.W.M.A., Coebergh, J.W., van Krieken, J.H.J.M., Schuurin, E., Kluin, P.M., van Dongen, J.J.M. (1999). Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia. *Mod Pathol*, 12(8), 794-805.

Diss, T.C., Peng, H., Wotherspoon, A.C., Isaacson, P.G., Pan, L. (1993). Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependant on primer selection and lymphoma type. *J Pathol*, 169, 291-295.

Dölken, L., Schüler, F., Dölken, G (1998). Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *Biotechniques*, 25(6), 1058-1064.

van Dongen, J.J.M., Seriu, T., Panzer-Grümayer, E.R., Biondi, A., Pongers-Willemse, M.J., Corral, L., Stolz, F., Schrappe, M., Masera, G., Kamps, W.A., Gadner, H., van WQering, E.R., Ludwig, W.-D., Basso, G., de Bruijn, M.A.C., Cazzaniga, G., Hettlinger, K., van der Droes-van den Berg, A., Hop, W.C.J., Riehm, H., Bartram, C.R. (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 352, 1731-1738.

van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P.A.S., Kummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J.H.J.M., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-

cell receptor gene recommendations in suspect lymphoproliferations. *Leukemia*, 17, 2257-2317.

Donovan, J.W., Ladetto, M., Zou, G., Neuberg, D., Poor, C., Bowers, D., Gribben, J.G. (2000). Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 95(8), 2651-2658.

Droese, J. (2000). Molekulargenetische Charakterisierung klonaler Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements und quantitative Bestimmung von Minimaler Resterkrankung bei erwachsenen Patienten mit ALL. Med. Diss. Göttingen.

Elgavish, R.A., Schroeder jr., H.W. (1993). A graphical user interface for the analysis of immunoglobulin variable domain sequences. *BioTechniques*, 15(6), 1066-1071.

Evans, P.A.S., Pott, C., Groenen, P.J.T.A., Salles, G., Davi, F., Berger, F., Garcia, J.F., van Krieken, J.H.J.M., Pals, S., Kluin, P., Schuurin, E., Spaargaren, M., Boone, E., Gonzalez, D., Martinez, B., Villuendas, R., Gameiro, P., Diss, T., Mills, K., Morgan, G.J., Carter, G.I., Milner, B.J., Pearson, D., Hummel, M., Jung, W., Ott, M., Canioni, D., Beldjord, K., Bastard, C., Delfau-Larue, M.H., van Dongen, J.J.M., Molina, T.J., Cabecadas, J. (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. *Leukemia* 21(2), 207-214.

Födinger, M., Winkler, K., Mannhalter, C., Chott, A. (1999). Combined polymerase chain reaction approaches for clonality detection in lymphoid neoplasms. *Diagn Mol Pathol*, 8(2), 80-91.

Foran, J.M., Gupta, R.K., Cunningham, D., Popescu, R.A., Goldstone, A., Sweetenham, J.W., Pettengell, R., Johnson, P.W.M., Bessell, E., Hancock, B., Summers, K., Hughes, J., Rohatiner, A.Z.S., Lister, T.A. (2000). A UK multicentre phase II study of rituximab (chimaeric anti-CD 20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. *Br J Haematol*, 109, 81-88.

Geisler, C.H., Kolstad, A., Laurell, A., Andersen, N.S., Pedersen, L.B., Jerkeman, M., Eriksson, M., Nordström, M., Kimby, E., Boesen, A.M., Kuittinen, O., Leuritzen, G.F., Nisson-Ehle, H., Ralfkiaer, E., Akerman, M., Ehinger, M., Sundström, C., Langholm, R., Delabie, J., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Brown, P., Elonen, E.; Nordic Lymphoma Group. (2008). Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in-vivo-purged stem cell rescue. A nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood*, 112(7), 2687-2693.

Ghielmini, M., Schmitz, S.F., Burki, K., Pichert, G., Betticher, D.C., Stupp, R., Wernli, M., Lohri, A., Schmitter, D., Bertoni, F., Cerny, T. (2000). The effect of Rituximab on patients with follicular and mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol*, 11 Suppl. 1, 123-126.

Gisselbrecht, C. (2012). Is there any role for transplantation in the rituximab era for diffuse large B-cell lymphoma? *Hematology* 2012, 410-416.

Gleissner, B., Maurer, J., Sindram, A., Reinhard, R., Thiel, E. (2001). Comparison of ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis and automated fragment-analysis for evaluation of IgH gene products. *Leukemia Res*, 25, 769-774.

Gribben, J.G., Neuberg, D., Freedman, A.S., Gimmi, C.D., Pesek, K.W., Barber, M., Saporito, L., Woo, S.D., Coral, F., Spector, N., Rabinowe, S.N., Grossbard, M.L., Ritz, J., Nadler, L.M. (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. *Blood*, 81(12), 3449-3457.

Gribben, J.G., Neuberg, D., Barber, M., Moore, J., Pesek, K.W., Freedman, A.S., Nadler, L.M. (1994). Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood*, 83(12), 3800-3807.

Gurbity, T.P., Bagdi, E., Groen, N.A., Budel, L.M., Abbou, M., Krenacs, L., Dinjens, W.N. (2003). Increased sensitivity of B-cell clonality analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded B-cell lymphoma samples using an enzyme blend with both 5'-3' exonuclease activity. *Virchows Arch*, 443(5), 643-648.

Hardingham, J.E., Kotasek, D., Sage, R. E., Gooley, L. T., Mi, J.-X., Dobrovic, A., Norman, J. E., Bolton, A. E., Dale, B. M. (1995). Significance of molecular marker-positive cells after autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for Non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 13(5), 1073-1079.

Harris, N.L. Jaffe, E.S., Diebold, J. et al., World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997, *JCO* 17: 3835-3849 (1999)

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 321-328.

Hirt, C., Dölken, G. (2000). Quantitative detection of t(14;18)-positive cells in patients with follicular lymphoma before and after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 25, 419-426.

Hitz, F., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Hoskins, P., Moccia, A.A., Savage, K.J., Sehn, L.H., Shenkier, T., Klasa, R. (2010). Outcome of patients with chemotherapy refractory or early progressive diffuse large B-cell lymphoma after R-CHOP treatment. *Blood*, 116, Abstract 1751.

Hoshino, A., Funato, T., Munakata, Y., Ishi, T., Abe, S., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Kameoka, J., Meguro, K., Sasaki, T. (2004). Detection of clone-specific immunoglobulin heavy chain genes in the bone marrow of B-cell-lineage lymphoma after treatment. *Tohoku J Exp Med*, 203, 155-164.

Howard, O.M., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., Grossbard, M., Poor, C., Janicek, M., Shipp, M.A. (2002). Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*, 20(5), 1288-1294.

Ilgenfritz, R.B., Kayasut, T., Le Tourneau, A., Calendini, O.A., Quafi, L., Matzac, C., Diebold, J., Devez, F., Ducruit, V., Bouchet, P.E., Audouin, J., Molina, T.J. (2009). Correlation between molecular and histopathological diagnoses of B cell lymphomas in bone marrow biopsies and aspirates. *J Clin Pathol*, 62(4), 357-360.

Inghirami, G., Szabolcs, M., Yee, H.T., Corradini, P., Cesarman, E., Knowles, D.M. (1993). Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest*, 68(6), 746-757.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., Weiss, U. (1991). Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354, 389-392.

Jacqy, C., Soree, A., Lambert, F., Bosly, A., Ferrant, A., Andre, M., Parma, J., Bentos, A. (2000). A quantitative study of peripheral blood stem cell contamination in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: one-half of patients significantly mobilize malignant cells. *Br J Haematol*, 110, 631-637.

Jolly, C.S., Wagner, S.D., Rada, C., Klix, N., Milstein, C., Neuberger, M.S. (1996). The targeting of somatic hypermutation. *Semin Immunol*, 8(3), 159-168.

Kang, Y.H., Park, C.J., Seo, E.J., Huh, J., Kim, S.B., Kang, Y.-K., Chi, H.S. (2002). Polymerase chain reaction-based diagnosis of bone marrow involvement in 170 cases of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 94, 3073-3082.

Kanteti, R., Miller, K.B., McCann, J.C., Roitman, D., Morelli, J., Hurley, C., Berkman, E., Schenkein, D.P. (1999). Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis. *Bone Marrow Transplantation*, 24, 473-481.

Kasamon, Y.L., Wahl, R.L., Ziessman, H.A., Blackford, A.L., Goodman, S.N., Fidyk, C.A., Rogers, K.M., Bolaños-Meade, J., Borowitz, M.J., Ambinder, R.F., Jones, R.J., Swinnen L.J. (2009). Phase II-study of risk-adapted therapy of newly diagnosed, aggressive non-Hodgkin lymphoma based on midtreatment FDG-PET scanning. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(2):242-8.

Kerlan-Candon, S., Soua, Z., Lefranc, M.-P., Clot, J., Eliaou, J.-F. (1998). Detection of antigen receptor gene rearrangements in lymphoproliferative malignancies by fluorescent polymerase chain reaction. *Tissue Antigens*, 51, 20-29.

Kneba, M., Bolz, I., Linke, B., Hiddemann, W. (1995). Analysis of rearranged T-cell receptor β -chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood*, 86(10), 3930-3937.

Kosari, F., Shishehbor, F., Saffar, H., Sadeghipour, A. (2013). PCR-based clonality analysis in diffuse large B-Cell lymphoma using BIOMED-2-primers of IgH (FR3) on formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Archives of Iranian Medicine*, 16 (9), 526-529.

Kremer, M., Cabras, A.D., Fend, F., Schulz, S., Schwarz, K., Hoefler, H., Werner, M. (2000). PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol*, 31(7), 847-853.

van Krieken, J.H.J.M., Langerak, A.W., Macintyre, E.A., Kneba, M., Hodges, E., Garcia-Sanz, R., Morgan, G.J., Parreira, A., Molina, T.J., Capecadas, J., Gaulard, P., Jasani, B., Garcia, J.F., Ott, M., Hannsmann, M.L., Berger, F., Hummel, M., Davi, F., Brüggemann, M., Lavender, F.L., Schuurin, E., Evans, P.A.S., White, H., Salles, G., Groenen, P.J.T.A., Gameiro, P., Pott, C., van Dongen, J.J.M. (2007). Improved reliability of lymphoma diagnosis via PCR-based clonality testing: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*, 21(2), 201-206.

Küppers, R., Rajewsky, K., Hansmann, M.L. (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol*, 27, 1398-1405.

Kurtz, D.M., Green, M.R., Bratham, S.V., Scherer, F., Liu, C.-L., Kunder, C.A., Takahashi, K., Glover, C., Keane, C., Kihira, S., Visser, B., Callahan, J., Kong, K., Faham, Corbelli, K.S., Miklos, D., Advani, R.H., Levy, R., Hicks, R.J., Hertzberg, M., Ohgami, R.S., Gandhi, M.K., Diehn, M., Alizadeh, A.A. (2015). Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood*, 125 (24): 3679-368.

Kwok, S., Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238.

Ladetto, M., Sametti, S., Donovan, J.W., Ferrero, D., Astolfi, M., Mitterer, M., Ricca, I., Grandi, D., Corradini, P., Coser, P., Pileri, A., Gribben, J.G., Tarella, C. (2001). A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients. *Exp Haematol*, 29, 183-193.

Langerak, A.W., van Krieken, J.H.J.M., Wolvers-Dettero, I.L.M., Kerkhoff, E., Mulder, A.H., Vrints, L.W.M.A., Coebergh, J.W., Schuurin, E., Kluin, Ph.M., van Dongen, J.J.M. (2001). The role of molecular analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol*, 54, 565-567.

Lee, S.E., Kang, S.Y., Yoo, H.Y., Kim, S.J., Kim, W.S., Ko, Y.H. (2016). Clonal relationships in recurrent B-cell lymphomas. *Oncotarget*, 7 (11), 12359-12371.

Lee, L.G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., Wilson, R.K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA

polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucl Acid Res*, 20, 2471-2483.

Linke, B., Pyttlich, J., Tiemann, M., Suttorp, M., Pawaresch, R., Hiddemann, W., Kneba, M. (1995a). Identification and structural analysis of rearranged immunoglobulin heavy chain genes in lymphomas and leukemias. *Leukemia*, 9, 840-847.

Linke, B., Bolz, I., Pott, C., Hiddemann, W., Kneba, M. (1995b). Use of UITma DNA polymerase improves the PCR detection of rearranged immunoglobulin heavy chain CDR3 junctions. *Leukemia*, 9, 2133-2137.

Linke, B., Bolz, I., Fayazzi, A., von Hofen, M., Pott, C., Bertram, J., Hiddemann, W., Kneba, M. (1997a). Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia*, 11, 1055-1062.

Linke, B. (1997b). Charakterisierung klonaler Schwereketten-Genrearrangements bei malignen B-Zell Lymphomen und Leukämien. *Biol Diss Göttingen*.

Liu, H., Bench, A.J., Bacon, C.M., Payne, K., Huang, Y., Scott, M.A., Erber, W.N., Grant, J.W., Du, M.Q. (2007). A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *Br J Haematol*, 138(1), 31-43.

Lombardo, J.F., Hwang, T.S., Maiese, R.L., Millson, A., Segal, G.H. (1996). Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis III: intermediate and high-grade B-cell neoplasms. *Human Pathol*, 27(4), 373-380.

Lossos, I.S., Czerwinski, D.K., Alizadeh, A.A., Wechser, M.A., Tibshirani, R., Botstein, D., Levy, R. (2004). Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Eng J Med*, 350(18), 1828-1837.

Maes, B., Demunter, A., Peeters, B., Verhoef, G., de Wolf-Peeters, C. (2000). Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry, and molecular analyses. *J Clin Pathol*, 53, 835-840.

Magni, M., Di Nicola, M., Devizzi, L., Matteucci, P., Lombardi, F., Gandola, L., Ravagnani, F., Giardini, R., Dastoli, G., Tarella, C., Pileri, A., Bonadonna, G., Gianni, A.M. (2000). Successful in vivo purging of CD34-containing peripheral blood harvests in mantle cell and indolent lymphoma: evidence for a role of both chemotherapy and rituximab infusion. *Blood*, 96(3), 864-869.

Mandigers, C.M.P.M., Meijerink, J.P.P., Raemaekers, J.M.M., Schattenberg, A.V.M.B., Mensink, E.J.B.M. (2001a). Graft-versus-lymphoma effect of donor leukocyte infusion shown by real-time quantitative PCR analysis of t(14;18). *The Lancet*, 352, 1522-1523.

Mandigers, C.M., Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Tonnissen, E.L., Hebeda, K.M., Bogman, M.J., Raemaekers, J.M. (2001b). Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood*, 98, 940-944.

Mattila, P.S., Schigk, J., Wu, H., Mäkelä, O. (1995). Extensive allelic sequence variation in the J region of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Eur.J.Immunol*, 25, 2578-2582.

Miglino, M., Santini, G., Grasso, R., Pietrasanta, D., Clavio, M., Pierri, I., Canepa, L., Nati, S., Ballerini, F., Varaldo, R., Palmisano, G., Gobbi, M. (2001). Molecular analysis of patients with relapsed or refractory intermediate-high grade non-Hodgkin's lymphoma with bone marrow infiltration undergoing peripheral blood progenitor cell transplantation. *Haematologica*, 86, 706-714.

Mitterbauer-Hohendanner, G., Mannhalter, C., Winkler, K., Mitterbauer, M., Skrabs, C., Chott, A., Simonitsch-Klupp, I., Gleiß, A., Lechner, K., Jaeger, U. (2004). Prognostic significance of molecular staging by PCR-amplification of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leukemia*, 18, 1102-1107.

Papavasiliou, F., Casellas, R., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Pelanda, R., Nemazee, D., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C. (1997). V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody response. *Science*, 278(5336), 298-301.

Pittaluglio, S., Tierens, A., Dodoo, Y.L., Delabie, J., de Wolf-Peeters, C. (1999). How reliable is histologic examination of bone marrow trephine biopsy specimens for the staging of Non-Hodgkin lymphoma? A study of hairy cell leukemia and mantle cell lymphoma involvement of the bone marrow trephine specimen by histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction techniques. *Am J Clin Pathol*, 111, 179-184.

Pollard, P., Owen, G., Worwood, M. (1993). PCR-based immunogenotyping at the Ig heavy chain CDR3 focus: improvements in resolution. *Br J Haematol*, 84(1), 169-171.

Pongers-Willemsse, M.J., Seriu, T., Stolz, F., d'Aniello, E., Gameiro, P., Gonzalez, M., Bartram, C.R., Panzer-Grümayer, E.R., Biondi, A., San Miguel, J.F., van Dongen, J.J.M. (1998a). Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. *Leukemia*, 13, 110-118.

Pongers-Willemsse, M.J., Verhagen, O.J.H.M., Tibbe, G.J.M., Wijkhuijs, A.J.M., de Haas, V., Roovers, E., van der Schoot, C.E., van Dongen, J.J.M. (1998b). Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional specific TaqMan probes. *Leukemia*, 12, 2006-2014.

Pott, C., Schrader, C., Gesk, S., Harder, L., Tiemann, M., Raff, T., Brüggemann, M., Ritgen, M., Gahn, B., Unterhalt, M., Dreyling, M., Hiddemann, W., Siebert, R., Dreger, P., Kneba, M. (2006). Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphom. *Blood*, 107(6), 2271-2278.

Pott, C., Hoster, E., Delfau-Larue, M. H., Beldjord, K., Böttcher, S., Asnafi, V., Plonquet, A., Siebert, R., Callet-Bauchu, E., Andersen, N., van Dongen, J. J., Klapper, W., Berger, F., Ribrag, V., van Hoof, A.L., Trneny, M., Walewski, J., Dreger, P., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Kneba, M., Kluin-Nelemans, C., Hermine, O., Macintyre, E., Dreyling, M. (2010). Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood*, 115(16), 3215-3223.

Pott, C., Brüggemann, M., Ritgen, M., van der Velden, V.H., van Dongen, J.J., Kneba, M. (2013). MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*, 971, 175-200.

Rambaldi, A., Lazzari, M., Manzoni, C., Carlotti, E., Arcaini, L., Baccarani, M., Barbui, T., Bernasconi, C., Dastoli, G., Fuga, G., Gamba, E., Gargantini, L., Gattei, V., Lauria, F., Lazzarino, M., Mandelli, F., Morra, E., Pulsoni, A., Ribersani, M., Rossi-Ferrini, P.L., Rupolo, M., Tura, S., Zagonel, V., Zaja, F., Zinzani, P.L., Reato, G., Foa, R. (2002). Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood*, 99(3), 856-862.

Rambaldi, A., Carlotti, E., Oldani, E., Della Starza, I., Baccarani, M., Cortelazzo, S., Lauria, F., Arcaini, L., Morra, E., Pulsoni, A., Rigacci, L., Rupolo, M., Zaja, F., Zinzani, P.L., Barbui, T., Foa, R. (2005). Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH⁺ cells at diagnosis predict treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 105(9), 3428-3433.

Ravetch, J.V., Siebenlist, U., Korsmeyer, S., Waldmann, T., Leder, P. (1981). Structure of the human immunoglobulin μ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell*, 27, 583-591.

de Re, V., de Vita, S., Carbone, A., Ferraccioli, G., Gloghini, A., Marzotto, A., Pivetta, B., Dolcetti, R., Boiocchi, M. (1995). The relevance of VDJ PCR protocols in detecting B-cell clonal expansions in lymphomas and other lymphoproliferative disorders. *Tumori*, 81, 405-409.

Riesner, D., Steger, G., Zimmat, R., Owens, R.A., Wagenhöfer, M., Hillen, W., Vollbach, S., Henco, H. (1989). Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, 10, 377-389.

Rockman, S.P. (1997). Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia*, 11, 852-862.

Roschewski, M., Dunleavy, K., Pittaluga, S., Moorhead, M., Pepin, F., Kong, K., Shovlin, M., Jaffe, E.S., Staudt, L.M., Lai, C., Steinberg, S.M., Chen, C.C., Zheng, J., Willis, T.D., Faham, M., Wilson, W.H. (2015). Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncology* 16 (5): 541-549.

Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Müller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Staudt, L.M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(25), 1937-1947.

Rosenwald, A., Burek, C., Ott, G. (2006). Maligne Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe. *Histologie und molekulare Pathologie. Onkologie*, 12, 603-611.

Rothaupt, D. (1995). Nachweis und Charakterisierung klonal rearrangierter T-Zell-Rezeptor-g-Gene bei Patienten mit malignen Lymphomen und Leukämien. *Med. Diss. Göttingen*.

Sanz, I. (1991). Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol*, 147(5), 1720-1729.

Scholten, C., Hilgarth, B., Hilgrath, M., Jaeger, U., Greinix, H.T., Mannhalter, C. (1997). Predictive value of clone-specific CDR 3 PCR in high-grade non-Hodgkin's lymphoma: long-term persistence of a clone-specific rearrangement in a patient with secondary high-grade NHL in remission after high-dose therapy. *Br J Haematol*, 97, 239-240.

Sebastián, E., Alcoceba, M., Balanzategui, A., Marín, L., Montes-Moreno, S., Flores, T., González, D., Sarasquete, M.E., Chillón, M.C., Puig, N., Corral, R., Pardal, E., Martín, A., González-Barca, E., Caballero, M.D., San Miguel, J.F., García-Sanz, R., González, M. (2012). Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am J Pathol*, 181(5), 1879-1888.

Segal, G.H. (1996). Assessment of B-cell clonality by the polymerase chain reaction: a pragmatic overview. *Adv Anatomic Pathol*, 3(3), 195-203.

Sehn, L.H. (2012). Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*, 2012, 402-409.

Sharp, J.G., Kessinger, A., Mann, S., Crouse, D.A., Armitage, J.O., Bierman, P., Weisenburger, D.D. (1996). Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in Non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol*, 14(1), 214-219.

Shiach, C.R., Evans, P.A., Short, M.A., Bailey, C.C., Lewis, I.J., Kinsey, S.E. (1993). Detection and accurate sizing of PCR product by automated scanning: improved detection of immunoglobulin gene rearrangements in ALL. *Br J Haematol* 85(2), 431-433.

Shipp, M.A., Harrington, D., Armitage J.O. (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*, 329, 987-994.

Shipp, M.A., Ross, K.N., Tamayo, P., Weng, A.P., Kutok, J.L., Aguiar, R.C., Gaasenbeek, M., Angelo, M., Reich, M., Pinkus, G.S., Ray, T.S., Koval, M.A., Last, K.W., Norton, A.,

Lister, T.A., Mesirov, J., Neuberg, D.S., Lander, E.S., Aster, J.C., Golub, T.R. (2002). Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 8(1), 68-74.

Slack, D.N., McCarthy, K.P., Wiedemann, L.M., Sloane, J.P. (1994). Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol*, 2(4), 223-232.

Storb, U. (1998). Progress in understanding the mechanism and consequences of somatic hypermutation. *Immunol Rev*, 162, 5-11.

Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER*Stat Database: Incidence-SEER 9 Regs. Public-Use, Nov 2002 Sub (1973-2000). National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Programm Cancer Statistics Branch, released April 2003

Sweetenham, J.W. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma: risk stratification and management of relapsed disease. *ASH Educational Book*, 252-259.

Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (2008): WHO Classification of Tumours and Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, IARC.

Theriault, C., Galoin, S., Valmary, S., Selves, J., Lamant, L., Roda, D., Rigal-Huguet, F., Brousset, P., Delsol, G., al Saati, T. (2000). PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. *Mod Pathol*, 13(12), 1269-1279.

Tomlinson, I.M., Cook, G.P., Walter, G., Carter, N.P., Riethman, H., Buluwela, L., Rabbitts, T.H., Winter, G. (1995). A complete map of the human immunoglobulin VH locus. *Ann N Y Acad Sci*, 764, 43-46.

Uchiyama, M., Maesawa, T., Yashima, A., Itabashi, T., Ishida, Y., Masuda, T. (2003a). Consensus primers for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell lymphomas. *J Clin Pathol*, 56, 778-779.

Uchiyama, M., Maesawa, C., Yashima, A., Tarusawa, M., Satoh, T., Ishida, Y., Ito, S., Murai, K., Enomoto, S., Utsugisawa, T., Motoyoshi, K., Masuda, T. (2003b). Development of consensus fluorogenically labelled probes of the immunoglobulin heavy-chain gene for detecting minimal residual disease in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Sci*, 94(10), 877-885.

Voena, C., Ladetto, M., Astolfi, M., Provan, D., Gribben, J.G., Boccadoro, M., Pileri, A., Corradini, P. (1997). A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia*, 11, 1793-1798.

Vose, J.M., Sharp, G., Chan, W.C., Nichols, C., Loh, K., Inwards, D., Rifkin, R., Bierman, P.J., Lynch, J.C., Weisenburger, D.D., Kessinger, A., Armitage, J.O. (2002). Autologous transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a randomized trial evaluating graft source and minimal residual disease. *J Clin Oncol*, 20(9), 2344-2352.

Wu, G.Q., Sharp, J.G., Wu, G., Vose, J., Greiner, T.C., Chan, W.C. (1997a). The detection of minimal lymphoma by molecular and combined culture-molecular methods. *Br J Haematol*, 99, 873-881.

Wu, G., Greiner, T.C., Chan, W.C. (1997b). Obtaining clone-specific primer and probe for the immunoglobulin heavy-chain gene from paraffin-embedded tissue of B-cell lymphoma: technical considerations. *Diagn Mol Pathol*, 6(3), 147-153.

Yashima, A., Maesawa, C., Uchiyama, M., Tarusawa, M., Satoh, T., Satoh, M., Enomato, S., Sugawara, K., Numaoka, H., Murai, K., Utsugisawa, T., Ispida, Y., Masuda, T. (2003). Quantitative assessment of contaminating tumor cells in autologous peripheral blood stem cells of B-cell non-Hodgkin lymphomas using immunoglobulin heavy chain gene allele-specific oligonucleotide real-time quantitative-polymerase chain reaction. *Leukemia Research*, 27, 925-934.

Yokohama, A., Karasawa, M., Sakai, H., Okamoto, K., Maehara, T., Tsukamoto, N., Tamura, J., Naruse, T., Sawamura, M., Shimano, S. (2001). Molecular detection of tumor cells at diagnosis invading the bone marrow and peripheral blood of patients with aggressive or indolent lymphomas. *Leukemia Research*, 25, 749-755.

Zhou, X.-G., Sandvej, K., Gregersen, N., Hamilton-Dutoit, S.J. (1999). Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 52, 104-110.

Ziepert, M., Hasenclever, D., Kuhnt, E., Glass, B., Schmitz, N., Pfreundschuh, M., Loeffler, M. (2010). Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, 28(14), 2373-2380.

Zwicky, C.S., Maddocks, A.B., Andersen, N., Gribben, J.G. (1996). Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in Non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood*, 88(9), 3314-3322.

7 ANHANG

| Pat.-Nr. | Diagnose, Stadium | Material | DNA-Nr. | IgH-CDR3-PCR | Genescan-Analyse |
|----------|-------------------|----------|---------|--------------|------------------|
| P01 | LB | PB | 893 | mono | 99 bp |
| P02 | CB I A | KM | 1308 | - | - |
| P03 | Cb I A | KM | 1480 | poly | poly |
| | | PB | 1490 | mono | 101 bp |
| P04 | LB, III B | KM | 1295 | poly | 110 bp vor HG |
| P05 | Ki-1 | KM | 1777 | - | - |
| P06 | Cb | PB | 1849 | Mono | 90 bp |
| P07 | CB, IV B | KM | 1807 | Poly | 105 bp vor HG |
| P08 | CB, III B | KM | 2149 | - | - |
| | | PB | 2066 | - | - |
| P09 | IB, IV B | PB | 1612 | Mono | 117 bp |
| P10 | MCL, III A | PB | 1613 | Mono | 89 bp |
| | | KM | 1643 | Mono | 89 bp |
| P11 | CB, I | KM | 1844 | Poly | Poly |
| P12 | Cb, I | KM | 2112 | - | - |
| | | PB | 2115 | - | - |
| P13 | Burkitt, I AE | KM | 1485 | Poly | Poly |
| P14 | CB, IV B | KM | 1717 | Poly | 98 bp vor HG |
| | | PB | 1724 | Poly | Poly |
| P15 | LB, I | PB | 1587 | Poly | Poly |
| P16 | Burkitt | PB | 861 | Poly | poly |
| P17a | CB, IV A | PB | 1543 | Mono | 106 bp |
| P17b | CB, IV A | KM | 1797 | Mono | 119 bp |
| P18 | CB, III A | PB | 1557 | Poly | poly |
| P19 | CB, IV A | KM | 51/96 | Poly | 104 bp vor HG |
| P20 | LB, IV A | KM | 1329 | Mono | 105 bp |
| P21 | CB | KM | 1818 | - | - |
| P22 | Burkitt, IV | PB | 1096 | Mono | 126 bp |
| | | KM | 1101 | Mono | 126 bp |
| P23 | CB, IV | KM | 1425 | Poly | poly |
| | | PB | 1590 | Mono | 117 bp vor HG |
| P24 | CB, II | KM | 901 | Poly | poly |
| P25 | CB, I AE | KM | 1237 | - | - |
| | | PB | 1341 | mono | 105 bp vor HG |
| P26 | MALT, IV | KM | 1603 | Mono | 108 bp |
| | | PB | 1592 | Mono | 108 bp |
| | | LK | P 380 | Mono | 108 bp |
| P27 | CB, II | KM | 1865 | Poly | 108 bp vor HG |
| P28 | CB, IV | KM | 1809 | Mono | 107 bp |
| | | Pleura | 1909 | Mono | 107 bp |
| P29 | CB | PB | 1498 | Poly | poly |
| P30 | CB | KM | 896 | Poly | 99 bp vor HG |
| P3131 | CB, II | KM | 1094 | - | - |
| | | PB | 1334 | Mono | 105 bp vor HG |
| P32 | CB, IV | PB | 1685 | Poly | 105 bp vor HG |
| P33 | Ki-1, II | PB | 1829 | Poly | poly |
| P34 | CB, III AE | KM | 1229 | - | - |
| | | PB | 1483 | Mono | 101 bp |
| P35 | CB, III | PB | 919 | Poly | poly |
| P36 | CB, I | KM | 1433 | Poly | 144 bp vor HG |
| | | PB | 1485 | Poly | 144 bp vor HG |
| | | LK | P 685 | Mono | 144 bp |

| | | | | | |
|------|------------|--------|--------|------|---------------|
| P37 | CB, III | KM | 1814 | - | - |
| P38 | CB, IV | KM | 1969 | - | - |
| | | PB | 1972 | - | - |
| P39 | CB, IV A | KM | 2170 | - | - |
| | | PB | 1996 | Mono | 110 bp |
| P40 | CB, I A | KM | 1864 | Poly | 105 bp vor HG |
| P41 | CB | Liquor | 1460 | Mono | 111 bp |
| P42 | CB, III | KM | 1948 | - | - |
| P43 | Burkitt, I | LK | P 283 | Poly | 129 bp vor HG |
| P44 | IB, IV | KM | 1880 | Mono | 128 bp |
| P45 | CB, II B | KM | 891 | Poly | poly |
| | | | | | |
| H 01 | CB | LK | 96/4 | Mono | 117 bp |
| H 02 | CB | LK | 218/7 | Mono | 113 vor HG |
| H 03 | CB | LK | 228/13 | Mono | 106 bp vor HG |
| H 04 | CB | LK | 366/21 | Mono | 92 bp |
| H 05 | Ki-1 | LK | 367/24 | - | - |
| H 06 | Ki-1 | LK | 425/27 | Poly | 114 bp vor HG |

Tabelle 13: Ergebnisse der Klonalitätsanalyse von 49 Patienten mit einem aggressiven B-NHL. Kursiv dargestellt sind darüber hinaus die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse zweier Patienten (P10 und P26) mit einem indolenten B-NHL, deren MRD-Verlauf im Rahmen einer autologen peripheren Blutstammzelltransplantation untersucht wurde.

| Patient | 5'-V | N-D _H -N(-D _H -N) | J _H -3' | D _H | J _H | Anzahl der Klone |
|---------|---------------|--|---------------------|----------------|-------------------|------------------|
| | | Direkt sequenzierte PCR-Produkte | | | | |
| P09 | CTGTGCGAGAGA | tgtTACTATGATAGTAGTGGTcccttcgat | GCTTTTGATATCTGGGGCC | XP3/21/9 | J _H 3b | |
| P10 | ACTGTGCGAGAGA | ccfCGCTacgacc | ACTGGGGCCA | K4 | J _H 4b | |
| P17b | ACTGTG | taaagagccccggggaggcTATTATGAaggcactgactac | GCTTTGGATGCTGGGG | XP5/22/12 | J _H 3a | |
| | | Nach TGGE direkt sequenzierte PCR-Produkte | | | | |
| Anhang | | | | | | |
| P17a | ACTG | ccfCATATTGTGGTtaigactgcttactt | CTTTGACTACTGGGG | LR3 | J _H 4b | |
| P28 | ACTGTGCGAGA | caTAATAGTAGcaccctggact | AACTGGTTCGACC | LR5 | J _H 5b | |
| P39 | ACTGTG | cgaaagATGGgcactcaagg | (TAC)5ATGGACGTCT | KX'1 | J _H 6d | |
| P44 | ACTGTG | ttcGGGGAGTTActaccggcatgctgtttgatat | CTGGGG | XP2/21/10 | J _H 5 | |

Tabelle 14 Fortsetzung nächste Seite

| | | Klonierte PCR-Produkte | | | | |
|----------|------------------|---|--|-------------|-------------------|---|
| P17a | ACTG | ccCATATTGTGGTtaigactgtacttactt | | LR3 | J _H 4a | 1 |
| | ACTG | ccCATATTGTGGTtaigactgc | | | | 1 |
| | ACTGTG | taaaagagcccgaggagcTATNATGAgacactgtactacgg | | XP5/21/12 | J _H 3a | 2 |
| | ACTGTG | CAAAAGATACCGCCATAGTATAGCAGTGGCTGGTG | | | J _H 4b | 3 |
| | ACTGTG | CGAGAGGTGACAATAGGATATTGTAGTGGTGGTAGCTGCTACCCGA TCTTCTC | | | | 1 |
| | TGGT-repeats | | | | | 6 |
| | | | | | | |
| P20 | TATTACAACGTGCCGA | GAAAGGTCCACCACCATTGGG | | | J _H 5 | 1 |
| | | GAAAGGTCCACCAGCATTGGG | | | J _H 5 | 1 |
| | CAAGAATGAGA | TAAANNCCACCACCATCTGGG | | | J _H 5 | 1 |
| P22 (PB) | ACTGTGCGAGAGAG | aggGCCAGTGGCTGGTACgaaatcccTACTAGTATTATTATGact | | LR3/LR4/XP2 | J _H 6 | 1 |
| | ACTGTGCGAGAGAG | aggGCCAGTGGCTGGTACgaaatcccTAGTAGTATTATTATGact | | LR3/LR4/XP2 | | 5 |
| | TGGT-repeats | | | | | 2 |

Tabelle 14 Fortsetzung nächste Seite

| | | | | | |
|----------|----------------|---|----------------------------|------|---|
| P22 (KM) | ACTGTGGGAGAGAG | agggGCAGTGGCTGGTACgaatcccTAGTAGTATTATTATGact | TGGACGCTGGGG | Jh6 | 2 |
| P25 | ACTGTG | caaaggataagggcgtggaggacggagattgccccggggg | TACTACTATTACCAT | JH6d | 1 |
| | ACTG | attctatccctccctctgtgccaatcctctgttttccc | TGGTCACC | | 1 |
| | ACTG | tcacagtctctcgcagt | TGGTCACC | | 1 |
| | ACTG | ccctattgtggtatgacigtattactctt | TGACTACTGGGGCCA | Jh4b | 1 |
| | ACTGTG | ttcatgtgccccaaatcacctccctctagtcocccgacacacaaacgnic | TGGTCACC | | 1 |
| | ACTGT | actacaggtccaccacaatnigt | CTGGTTGACCCCTGGGG | Jh5b | 1 |
| | ACTGTG | cgagcatgttagaacangaggcggggcttntaccacaggncccatngaacn | TGGTCACC | | 1 |
| | TGGT-repeats | | | | 3 |
| P26 | ACTGTG | caaaagataccggccataGTATAGCAG | TGGCTGGTACTACTGGG GCCAG | Jh4b | 4 |
| | TGGT-repeats | | | | 3 |
| P31 | ACTGTG | cgagcagggtagcagcaactggg | CTGGTTGACCCCTGGGG | Jh5b | 1 |
| | ACTGTG | caagcagggtagcagcagctggg | CTGGTTCCACCCCTGGGG | Jh5b | 2 |

Tabelle 14 Fortsetzung nächste Seite

| | | | | | |
|-----|--------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------|---|
| | ACTGTG | cgagcagggtgagcagcagctggg | CTGGTTCGACCCCTGGGG | Jh5b | 1 |
| | ACTG | gggtcacgctctctctgcagtt | | | 1 |
| | TGGT-repeats | | | | 3 |
| | | | | | |
| P44 | ACTGTG | ttcGGGGAGTTctaccggcatcgatgcttttgatat | CTGGGGCCCAAGGGACCCT GGT | Jh5 XP2/21/10 | 1 |
| | TGGT-repeats | | | | 1 |

Tabelle 14 : Sequenzen der IgH-CDR3-PCR-Produkte. Die Regionen der nach dem Zufallsprinzip eingefügten N-Nukleotide sind mit Kleinbuchstaben dargestellt. Aus der Sequenz nicht eindeutig bestimmbar Nukleotide wurden mit N bezeichnet. Die Gensegmente wurden nach veröffentlichten Keimbahnsequenzen benannt (Ravetch 1981, Linke 1997)

| Patient | 5'-V _H | N-D _H -N(-D _H -N) | J _H -3' | D _H | J _H |
|---------|-------------------|---|------------------------------------|----------------|-------------------|
| Gö 09 | CTGTGCGAGAGA | tggTACTATGATAGTAGTGGT <u>cccttcgat</u> | <u>GCTTTTGATATCA...</u> | XP3/21/9 | J _H 3b |
| Gö 10 | ACTGTGCGAGAGA | cttCGCT <u>acgacc</u> | <u>ACTGGGGCCAGGG...</u> | K4 | J _H 4b |
| Gö 17a | ACTG | ccctCATATTGTGGT <u>tatgactgctattactt</u> | <u>CTTTGACTACTGGGGCCAAAGG...</u> | LR3 | J _H 4a |
| Gö 17b | ACTGTG | taaaagccccggggagcTATTATG <u>Agggcactgactac</u> | <u>GCTTTTGATGTCTGGGGCCAA...</u> | XP5/22/12 | J _H 3a |
| Gö 22 | ACTGTGCGAGAGAG | agggGCAGTGGCTGGTAC <u>gactccTAGTAGTATTATTATGAct</u> | TGGACTGTCTGGG... | LR3/LR4/XP | J _H 6b |
| Gö 26 | ACTGTG | caaa <u>gataccggccataGTATAGCAG</u> | TGGCTGGTGACTACTGGGGCCA... | | J _H 4b |
| Gö 28 | ACTGTGCGAGA | caTAATAGT <u>Agcactggact</u> | <u>AACTGGTTCGACCCCTGGGGCC...</u> | LR5 | J _H 5b |
| Gö 31 | ACTGTG | <u>cgagcaggtggagcagcAACTGGG</u> | GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGG... | HQ52 | J _H 5b |
| Gö 39 | ACTGTG | cgaagATGG <u>gcactcaagg</u> | <u>(TAC)5ATGGACGTCTGGGGCCA....</u> | KX'1 | J _H 6d |
| Gö 44 | ACTGTG | ttcGGGGAGTT <u>Actaccggcagatgcttttgatat</u> | CTGGGGCCAAAGGGACCCCTGGT... | XP2/21/10 | J _H 5 |

Tabelle 15: Sequenzen der IgH-CDR3-PCR-Produkte. Die Regionen, die nach dem Zufallsprinzip eingeführten N-Nukleotide sind mit Kleinbuchstaben dargestellt. Die Gensegmente wurden nach veröffentlichten Keimbahnsequenzen bezeichnet. Die Position der klonenspezifischen Primer für die N-PCR ist unterstrichen und fettgedruckt.

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Professor Dr. Dr. Michael Kneba, mir mit der Überlassung dieses interessanten Themas einen Einblick in die molekulare Hämatologie ermöglicht zu haben sowie für die mannigfaltige logistische und materielle Unterstützung in seinem Labor.

Ich danke Ingrid Bolz, Frau Dr. Bärbel Linke und Herrn PD Dr. Joachim Bertram für ihre Geduld und die Einführung in die molekulargenetischen Arbeitstechniken.

Die gemeinsame Arbeit und der kollegiale Austausch mit Jo Droese und Klaus Bonnekessen haben mich sehr bereichert. Beide haben mich durch so manches Tief begleitet und mich immer wieder ermutigt.

Bei Herrn Prof. Dr. H.A. Horst bedanke ich mich für sorgfältige und wirklich rasche Korrektur der Arbeit.

Ich danke Jens Hohmuth, Thorsten Graf, Uwe Jantzen und Dr. Heiko Trautmann sehr für ihre geduldige Hilfe bei der Erstellung der Grafiken.

Ein ganz besonderer Dank gilt am Ende meiner Familie für ihre immerwährende moralische und materielle Unterstützung, mit der sie mir das Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name Matthias von Hofen
 geboren am 17.09.1970
 in Aurich, Deutschland

Ausbildung

1976 – 1980 Lambertischule Aurich (Grundschule)
 1980 – 1982 Orientierungsstufe Waldschule Aurich-Egels
 1982 – 1989 Gymnasium Ulricianum Aurich
 1989 – 1991 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Aurich, Zentralapotheke und
 Abt. für Unfallchirurgie und Orthopädie
 1991 – 1992 Studium der Mittleren und Neueren Geschichte und der Politologie,
 Georg-August-Universität Göttingen (Magister)
 1992 – 1999 Studium der Humanmedizin, Georg-August-Universität Göttingen
 12.04.1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 14.04.1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 27.04.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

06-07/95 Abteilung für Allgemein-, Thorax- und Gefässchirurgie,
 Kreiskrankenhaus Aurich
 02-03/96 Abteilung für Hämatologie und Internistische
 Onkologie, Universitätsklinikum Göttingen
 08/96 Onkologische Schwerpunktpraxis Dres. M. Meyer und A. Ammon,
 Göttingen
 01-02/97 Bone Marrow Transplant Service, Dana Farber Cancer
 Institute/Brigham Women's and Children Hospital, Boston, U.S.A.

Praktisches Jahr

04/98 – 08/98 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Rettungsmedizin,
 Zentralkrankenhaus Links der Weser, Bremen
 08/98 – 11/98 Klinik für Allgemeine Innere Medizin, Zentralkrankenhaus Links
 der Weser, Bremen
 11/98 – 03/99 Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie, Zentralkrankenhaus
 Links der Weser, Bremen.

Klinik für Herz-, Thorax- und gefässchirurgie, Zentralkrankenhaus
Links der Weser, Bremen

Department of Trauma, Surgical Critical Care & Surgical
Emergencies, Yale/New Haven Hospital, Yale School of Medicine,
New Haven, Connecticut, U.S.A.

Ärztliche Tätigkeit

| | |
|----------------------------|---|
| 01.06.1999 – 31.05.2015 | Assistenzarzt in der 2. Medizinischen Klinik und Poliklinik im Städtischen Krankenhaus Kiel |
| seit 01.06.2015 | Angestellter Arzt in der Onkologischen Schwerpunktpraxis Kiel (Praxisinhaber Dr. H. Bolouri) |
| 01.12.2000 | Vollapprobation |
| 09.06.2010 | Facharztprüfung Innere Medizin |
| 28.01.2015 | Schwerpunktbezeichnung Hämatologie und Internistische Onkologie |

Dissertation

| | |
|--------------|---|
| Thema: | Molekulargenetische Charakterisierung klonaler Immunglobulingen-Rearrangements und Bestimmung von minimaler Resterkrankung bei aggressiven Non-Hodgkin- Lymphomen der B-Zell-Reihe |
| Doktorvater: | Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba, Direktor, Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. |