

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

**KLONALE REARRANGEMENTS DES
IMMUNGLOBULINLEICHTKETTENGENS KAPPA ALS MARKER DER
MINIMALEN RESTERKRANKUNG BEI MANTELZELL-LYMPHOMEN**

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

vorgelegt von
URS THORE HARALD TÄTWEILER
aus Berlin

Kiel 2021

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Christiane Pott

2. Berichterstatterin:

Priv.-Doz. Dr. med. Ulrike Wehkamp

Tag der mündlichen Prüfung:

25.01.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

07.10.2021

gez.: Prof. Dr. med. Heinz-August Horst
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | III |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Charakteristika des Mantelzell-Lymphoms..... | 1 |
| 1.2 Molekulargenetischer Hintergrund des MCL..... | 1 |
| 1.3 Prävalenz und Therapie des MCL..... | 2 |
| 1.4 Prätherapeutische Prognoseabschätzung des MCL..... | 3 |
| 1.5 Minimale Resterkrankung bei MCL..... | 3 |
| 1.6 Limitationen der MRD-Diagnostik bei MCL..... | 5 |
| 1.7 Immunglobulinleichtkette kappa als Marker der MRD-Diagnostik bei MCL | 5 |
| 2. Material und Methoden..... | 9 |
| 2.1 Untersuchungsmaterial und Untersuchungsablauf..... | 9 |
| 2.1.1 EUMCL-Studie für ältere Patienten | 9 |
| 2.1.2 EUMCL-Studie für jüngere Patienten..... | 10 |
| 2.1.3 Zeitpunkte der MRD-Diagnostik..... | 10 |
| 2.1.4 Arbeitsablauf der Materialaufarbeitung und der Untersuchungsschritte | 11 |
| 2.2 Materialaufarbeitung..... | 11 |
| 2.2.1 Durchflusszytometrie..... | 11 |
| 2.2.2 DNA-Extraktion aus EDTA-fixiertem Blut und Knochenmarkaspirat..... | 11 |
| 2.2.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung..... | 11 |
| 2.3 Klonalitätsanalyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 12 |
| 2.3.1 Konsensus-PCR für Immunglobulinenrearrangements | 12 |
| 2.3.1.1 Komplette IgH VH-DH-JH-Umlagerungen..... | 13 |
| 2.3.1.2 Inkomplette IgH DH-JH-Umlagerungen | 14 |
| 2.3.1.3 Ig κ -Umlagerungen..... | 15 |
| 2.3.2 Translokation t(11;14)..... | 15 |
| 2.3.3 Agarosegelelektrophorese..... | 16 |
| 2.4 Fragmentlängenanalyse mit GeneScan™ bzw. Heteroduplex-Gel..... | 17 |
| 2.4.1 Prinzip der GeneScan™-Analyse..... | 17 |
| 2.4.2 Klonalitätsanalyse von PCR-Produkten durch Fragmentanalyse (GeneScan™) | 18 |
| 2.4.3 Probenvorbereitung für die Elektrophorese | 19 |
| 2.4.4 Auftrennung über Polyacrylamid-Gele: Prinzip der Heteroduplex-Analyse..... | 19 |
| 2.4.5 Erstellung von Homo-und Heteroduplices | 20 |
| 2.5 Sequenzierung des B-Zell-Klons nach Sanger | 21 |
| 2.5.1 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion | 21 |
| 2.5.2 Sequenzierreaktion..... | 22 |

| | |
|---|-----|
| 2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Sequenzierung..... | 22 |
| 2.6 Mutationsanalyse der Immunglobulingenrearrangements..... | 23 |
| 2.7 Quantifizierung des MRD-Niveaus mit real-time quantitative PCR (RQ-PCR) | 23 |
| 2.7.1 Design der patientenspezifischen Primer | 24 |
| 2.7.2 RQ-PCR-Ansatz | 25 |
| 2.7.3 Erstellen von Standardkurven für die RQ-PCR | 27 |
| 2.7.4 Albuminstandard | 28 |
| 2.7.5 Bestimmung des MRD-Niveaus..... | 29 |
| 2.8 Puffer, Lösungen und Medien, Chemikalien, Materialien und Geräte..... | 29 |
| 2.9 Statistische Analyse..... | 32 |
| 3. Ergebnisse | 33 |
| 3.1 Nachweis der Klonalität mittels Konsensus-PCR und GeneScan™ | 33 |
| 3.2 Ergebnisse der Sequenzierung | 34 |
| 3.3 Struktur der Ig κ -Gensequenzen | 36 |
| 3.4 RQ-PCR | 38 |
| 3.4.1 Sensitivität und Spezifität der allelspezifischen Ig κ RQ-PCR Assays..... | 41 |
| 3.4.2 Quantifizierung von Verlaufsmaterialien mit RQ-PCR..... | 48 |
| 4. Diskussion..... | 53 |
| 4.1 Prämisse und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... | 53 |
| 4.2 Klonalitätsanalyse..... | 53 |
| 4.3 Gensequenzanalyse..... | 54 |
| 4.4 MRD-Analyse mit RQ-PCR und deren Limitationen..... | 55 |
| 4.5 Einfluss der N-Regionen auf die MRD-Diagnostik und Vergleich mit anderen Entitäten..... | 57 |
| 4.6 Weitere Einflussfaktoren auf die MRD-Diagnostik..... | 60 |
| 4.7 Fazit..... | 61 |
| 5. Zusammenfassung | 63 |
| 6. Literaturverzeichnis | 65 |
| 7. Anhänge..... | 75 |
| 7.1 Auflistung der in dieser Arbeit erhaltenen Ig κ -J κ -Sequenzen..... | 75 |
| 7.2 Auflistung der in dieser Arbeit erhaltenen Ig κ -KDE-Sequenzen | 82 |
| 7.3 Sequenzen der in dieser Arbeit erstellten Primer..... | 92 |
| 7.4 Vergleich der Verdünnungsreihentestung zu den Merkmalen der N-Regionen..... | 94 |
| 7.5 Charakteristika der einzelnen MRD-Targets in der Verdünnungsreihentestung..... | 96 |
| 7.6 Ergebnisse der paarweisen Testung der Längen der N-Region | 101 |
| 8. Danksagung..... | 103 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|--|
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASO | allele specific oligonucleotide |
| BC | buffy coat |
| BCL1 | B-cell lymphoma 1 |
| BCL2 | B-cell lymphoma 2 |
| BM | bone marrow, siehe auch KM |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BTK | Bruton-Tyrosinkinase |
| CLL | chronische lymphatische Leukämie |
| CD | cluster of differentiation |
| CDR | complementarity determining region |
| Ct | cycle threshold |
| Dexa-BEAM | Chemotherapieregime aus Dexamethason, BCNU, Etoposid, Cytarabin, Melphalan |
| dH ₂ O | deionisiertes H ₂ O |
| dNTPs | desoxyribo-Nukleosidtriphosphate |
| ddNTPs | didesoxyribo-Nukleosidtriphosphate |
| ECOG | Eastern Cooperative Oncology Group |
| EUMCL | Europäisches Mantelzell-Lymphom Netzwerk |
| FAM | 6-Carboxy-Flourescein |
| FP | Vorwärtsprimer (forward primer) |
| FR | framework region |
| Ig | Immunglobulin |
| IgH | Immunglobulinschwerkette |
| Ig κ | Immunglobulinleichtkette Typ kappa |
| Ig κ -J κ | Synonym zu V κ -J κ bei Rekombinationen in Analogie zur Abkürzung Ig κ -KDE |
| Ig κ -KDE | zusammenfassende Bezeichnung für „V κ -KDE bzw. Intron/RSS-KDE“ |
| Ig λ | Immunglobulinleichtkette Typ lambda |
| Intron/RSS | Intron/recombination signal sequence |
| J κ | Joining-Region des Gens der Immunglobulinleichtkette Typ kappa |
| KDE | kappa deleting element |
| KM | Knochenmark bzw. -aspirat, siehe auch BM |
| MCL | Mantelzell-Lymphom |
| MGB | minor groove binder |
| MIPI | MCL International Prognostic Index |

| | |
|------------|---|
| MRD | minimal residual disease - Minimale Resterkrankung |
| MTC | major translocation cluster |
| NFQ | nicht-fluoreszierender Quencher |
| NTC | no template control |
| PB | peripheres Blut |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| QR | quantitative range - quantitativer Messbereich |
| R-CHOP | Chemotherapieregime aus Rituximab, Cyclophosphamid, Vincristin, Prednisolon |
| R-DHAP | Chemotherapieregime aus Rituximab, Hochdosis-Cytarabin, Cisplatin |
| R-FC | Chemotherapieregime aus Rituximab, Fludarabin, Cyclophosphamid |
| ROX | 6-Carboxy-Rhodamin |
| RP | Rückwärtsprimer (reverse primer) |
| RQ-PCR | real-time quantitative PCR |
| RSS | recombination signal sequence |
| TBE-Puffer | TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA-Puffer |
| TdT | terminale Desoxyribonukleotidyltransferase |
| TAMRA | Tetramethylrhodamin |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| V κ | Variable-Region des Gens der Immunglobulinleichtkette Typ kappa |

1. Einleitung

1.1 Charakteristika des Mantelzell-Lymphoms

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) ist eine lymphoproliferative Erkrankung der B-Zell-Reihe (Swerdlow et al. 2008). Erstmals wurde es in den 1970er Jahren als zentrozytisches Lymphom von den anderen Non-Hodgkin-Lymphomen abgegrenzt (Lennert et al. 1975). Seit 1992 bezeichnet es unter seinem heutigen Namen eine Erkrankung, die auf naive B-Zellen zurückgeht, welche das Keimzentrum noch nicht durchlaufen haben (Banks et al. 1992). Die Zugehörigkeit des MCL zu Primärfollikeln oder der Mantelzone von Sekundärfollikeln lässt sich durch immunologische Untersuchungen und den nur selten möglichen Nachweis von ausgeprägten somatischen Mutationen in den Immunglobulingenen belegen (Hummel et al. 1994; Du et al. 1997). In aktuelleren Untersuchungen wird die Rate der mutierten V(ariablen)-Gensequenzen des Immunglobulinschwerkettengens mit ca. 30% angegeben. Dabei geht man von einem cut-off von 2% mutierten Nukleotiden gegenüber der Keimbahnsequenz aus. (Kienle et al. 2003; Orchard et al. 2003). Die Frage nach einem Antigenkontakt im Rahmen der Entstehung des Mantelzell-Lymphoms bzw. einer Untergruppe mit einem solchen und nach der Relevanz in Bezug auf den Krankheitsverlauf ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Es werden zytologisch zwei Formen des MCL unterschieden, das klassische und das blastoide MCL. Die klassische Variante stellt die häufigste Gruppe der MCL dar und ist gekennzeichnet durch eine Population kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit wenig Zytoplasma, unregelmäßig geformten, oftmals gekerbten Zellkernen mit gleichmäßig verteiltem Chromatin und unauffälligen Nucleoli. Die blastoide Variante macht etwa 20% der Fälle aus und zeichnet sich durch ein pleomorphes Zellbild großer Zellen mit fein verteiltem Chromatin und Nucleoli sowie einem hohen mitotischen Index aus. Immunhistologisch ist das MCL charakterisiert durch eine Expression der B-Zell Marker CD19, CD20, CD22 und CD79a (CD - cluster of differentiation) sowie in den meisten Fällen Immunglobulin M (IgM) mit häufiger Koexpression von Immunglobulin D (IgD) (Swerdlow et al. 1983; Harris et al. 1984).

1.2 Molekulargenetischer Hintergrund des MCL

Spezifisch für das MCL ist eine Überexpression von Cyclin D1, welches eine entscheidende Rolle in der G1-Phase des Zellzyklus und beim Übergang von der G1- zur S-Phase spielt. Die verstärkte Expression beruht auf der für das MCL charakteristischen Chromosomentranslokation t(11;14)(q13;q32), welche erstmals 1979 beschrieben wurde (van den Berghe et al. 1979). Die Translokation lässt sich mittels zytogenetischer und molekulargenetischer Methoden in über 95% der MCL nachweisen (Siebert et al. 1998). Eine Überexpression von Cyclin D1 ist von hoher diagnostischer Relevanz und der immunhistochemische Nachweis gehört heute zur Routinediagnostik des Mantelzell-Lymphoms (Levy et al. 1999; Yatabe et al. 2000). Translokationspartner sind zum einen der Genlocus der Immunglobulinschwerkette (IgH) auf Chromosom 14, zum anderen die Genregion BCL1 (B-cell lymphoma 1) auf Chromosom 11q13. 1991 konnte das auf Chromosom 11 befindliche Protoonkogen

unabhängig von zwei Arbeitsgruppen kloniert werden (Rosenberg et al. 1991; Withers et al. 1991). Es handelt sich um das Gen CCND1, das für das Zellzyklusprotein Cyclin D1 kodiert. Durch die Translokation in die „Joining-Region“ des IgH-Gens kommt es zu einer Überexpression von Cyclin D1 und nachfolgend zu einem Verlust der Regulation des Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase. Sowohl die Chromosomentranslokation t(11;14) als auch die von ihr hervorgerufene Überexpression von Cyclin D1 sind also diagnostisch sowie für die Krankheitsentstehung von Relevanz.

1.3 Prävalenz und Therapie des MCL

Das MCL zählt mit einem Anteil von ca. 3-10% zu den seltenen Entitäten unter den Non-Hodgkin Lymphomen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 60 Jahren, vornehmlich sind Männer betroffen (2:1) (Swerdlow und Williams 2002). Das mediane Gesamtüberleben nach Diagnosestellung beträgt zwischen drei und vier Jahren, wobei neuere Studien Steigerung auf fünf bis sechs Jahre zeigen konnten (Herrmann et al. 2009; Meusers et al. 1989).

Die Therapie des Mantelzell-Lymphoms ist unter anderem aufgrund unterschiedlicher Krankheitsverläufe zu großen Teilen nicht standardisiert, sondern weiterhin Gegenstand von klinischer Forschung. Aktuelle Therapieschemata beinhalten eine Immunchemotherapie mit monoklonalen anti-CD20-Antikörpern in Kombination mit verschiedenen Chemotherapieregimen. Für therapienaive Patienten unter 65 Jahren, die für eine intensive Therapie und eine autologe Stammzelltransplantation geeignet sind, ist eine Induktionstherapie mit Hochdosis-Cytarabin-basierten Chemotherapieregimen heute Mittel der Wahl (Robak et al. 2019; Martin et al. 2017). Diese Erstlinientherapie bietet einen Vorteil für das krankheitsfreie Überleben und ist für Patienten unter 65 Jahren als Standard anzusehen (Hermine et al. 2016; Harel et al. 2011).

Patienten, die zum Beispiel aufgrund ihres Alters nicht für eine intensive Therapie in Frage kommen, werden mit einer Kombination aus einem anti-CD20-Antikörper und einer Anthrazyklin-basierten Kombinationschemotherapie behandelt. Als Alternative dazu wurde in der letzten Zeit eine Kombination aus anti-CD20-Antikörper und Bendamustin etabliert (Robak et al. 2019).

Trotz effektiver Erstlinientherapien erleiden viele Patienten ein Rezidiv. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhaltungstherapie mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab bei älteren Patienten mit MCL ein frühes klinisches Rezidiv verhindern und das Gesamtüberleben verbessern kann (Kluin-Nelemans et al. 2012). Die französische LYMA-Studie konnte auch für jüngere Patienten zeigen, dass eine Rituximab-Erhaltungstherapie nach autologer Stammzelltransplantation das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben verbessert (Le Gouill et al. 2017).

Bei rezidiertem oder refraktärem MCL konnte in der jüngeren Vergangenheit die Behandlung mit BTK- bzw. BCL2-Inhibitoren (BTK - Bruton-Tyrosinkinase, BCL2 - B-cell lymphoma 2) als Therapieoptionen Erfolge zeigen (Tam et al. 2018). Die Behandlung mit diesen Substanzen hat jedoch in einem nicht unerheblichen Maße mit primären oder erworbenen Resistenzen zu kämpfen und ihre Anwendung ist weiter Gegenstand von klinischen Studien (Kahl et al. 2019; Agarwal et al. 2018).

1.4 Prätherapeutische Prognoseabschätzung des MCL

Gerade vor dem Hintergrund häufiger Rezidive und verschiedener Therapieoptionen ist es umso wichtiger, Aussagen über die Qualität und die Dauer des Ansprechens der Krankheit auf die Behandlung machen zu können. Mit dem MCL International Prognostic Index (MIPI), bestehend aus den vier unabhängigen Faktoren Alter, ECOG-Status (ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group), Laktatdehydrogenase und Anzahl der weißen Blutzellen, gibt es vor Beginn der Therapie ein Instrument zur Prognoseerfassung (Hoster et al. 2008; Hoster et al. 2014). Eine Abschätzung des individuellen Risikos unter der Therapie ist damit aber nicht möglich.

1.5 Minimale Resterkrankung bei MCL

Die Erfassung der Minimalen Resterkrankung (MRD) mittels real-time quantitative PCR (RQ-PCR) ist eine Technik zur Abschätzung des Anteils residueller Lymphom- oder Leukämiezellen während und nach der Therapie. Molekulargenetisches Ziel der Untersuchung sind dabei distinkte Gensequenzen der klonal expandierten Malignomzellen, z.B. Genrearrangements. Es konnte gezeigt werden, dass sich mittels MRD-Untersuchung frühzeitig vor dem Erreichen von klinischen Endpunkten Aussagen über das Ansprechen auf verschiedene Therapieschemata treffen lassen. Außerdem ist es möglich, die Kinetik der Erkrankung unter der Therapie zu beobachten, vom initialen Abfall der Tumorlast bis zum eventuellen Auftreten erneuten Tumorwachstums nach Ende der zytostatischen Therapie (Pott et al. 2006; Brüggemann et al. 2012; Brüggemann et al. 2004; Gökbuget et al. 2002). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass das molekulare Ansprechen mit der Dauer des Ansprechens auf die Therapie korreliert und als Prognosefaktor verwendet werden kann (Pott et al. 2010; Brüggemann et al. 2012; Gökbuget et al. 2012; Bassan et al. 2009). Das Paradebeispiel der Möglichkeiten dieser Diagnostik ist die akute lymphatische Leukämie (ALL), bei der die MRD-Diagnostik fester Bestandteil des Therapialgorithmus ist und sowohl zur Risikoabschätzung als auch zur Therapiesteuerung eingesetzt wird. Bei vielen anderen lymphatischen bzw. leukämischen Erkrankungen, wie auch dem MCL, konnte nachgewiesen werden, dass eine molekulare Remission mit einem deutlich besseren klinischen Outcome verbunden ist (Pott et al. 2010; Kolstad et al. 2017). Beim Mantelzell-Lymphom wird die MRD-Diagnostik aktuell vor allem im Rahmen klinischer Studien angewandt.

Zur Überwachung der Therapie und zur Therapieentscheidung mittels MRD-Analyse ist das Vorhandensein zumindest eines molekulargenetischen Markers nötig. Für das MCL werden dafür heute klonale Rearrangements der V(ariable)-, D(iversity)- und J(oining)-Gensequenzen des Immunglobulinschwerkettengens (IgH) ebenso zur MRD-Diagnostik herangezogen wie die Chromosomentranslokation t(11;14).

Das klonale Rearrangement des IgH-Genlocus erfolgt physiologisch im Rahmen der B-Zell-Reifung jeder B-Zelle. Hierbei wird das auf Chromosom 14 befindliche Gen der Immunglobulinschwerkette rekombiniert, sodass schließlich das Gen für einen funktionellen B-Zell-Rezeptor entsteht. Das Gen besteht aus einem variablen und einem konstanten Bereich. Im variablen Bereich liegen die Genabschnitte

der V(ariable)-, D(iversity)- und J(oining)-Region der Immunglobulinschwerkette (heavy chain; die Genabschnitte werden entsprechend als VH, DH, JH bezeichnet). Die V-Region beinhaltet vier hochgradig konservierte framework regions (FR1-4) sowie drei dazwischen liegende complementarity determining regions (CDR1-3). FR1-3 sind Ziele von Konsensus-PCRs, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet werden. Insgesamt gibt es im IgH-Genlocus 44 potentiell funktionsfähige VH-, 27 DH- und 6 JH-Gensegmente. Ziel der Rekombination sind komplette VH-DH-JH-Umlagerungen. Dabei geht dem kompletten VH-Rearrangement das inkomplette DH-JH-Rearrangement in der frühen B-Vorläuferzelle voraus (Ghia et al. 1998).

Nach Umlagerung der V-, D- und J-Segmente der Keimbahn des IgH-Gens (somatische Rekombination) entstehen an den Fusionsstellen sogenannte N-Regionen (junktionale Diversifikation), welche maßgeblich zur Einzigartigkeit der Fusionssequenz beitragen. Die N-Regionen zeichnen sich durch Deletionen durch Exonukleasen bzw. durch die Insertionen nicht keimbahnkodierter N („non-template“-Nukleotide durch das Enzym terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) aus (Matsuda et al. 1998; Küppers et al. 1999; van Dongen und Wolvers-Tettero 1991). Zusammen mit den N-Regionen bilden die fusionierten V-, D- und J-Segmente die funktionellen Schwereketten Gene. Anschließend werden die kappa- oder lambda-Leichtkette des Immunglobulins nach dem gleichen Mechanismus rearrangiert (wobei die D-Segmente bei den Leichtketten Genen fehlen) (Weichhold et al. 1993). Zusammen mit der somatischen Hypermutation in den Keimzentren der Lymphknoten bilden die somatische Rekombination und die junktionale Diversifikation die Grundlage für die Diversität der Antikörper von ca. 10^{12} Epitopen (Tonegawa 1983).

Jede der genannten Genumlagerungen ist für die jeweilige B-Zelle spezifisch und kann daher theoretisch als klonaler Marker zur Charakterisierung von Lymphomen oder Leukämien und zur Detektion der Minimalen Resterkrankung herangezogen werden. Ebenso führt auch die Translokation t(11;14) zu einer solchen einmaligen Gensequenz (Williams et al. 1987; Williams et al. 1993). Mittels eines für die jeweilige klonale Genumlagerung spezifischen Primers (sog. allele-specific-oligonucleotide-(ASO)-Primer) und eines zweiten Primers, der in einer konservierten Region in der Nähe der spezifischen Sequenz bindet, lässt sich mithilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein spezifisches Amplifikat erhalten. Die ASO-PCR erlaubt dabei nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Aussage über die Menge residueller Tumorzellen, wenn sie im Rahmen quantitativer PCR-Verfahren wie der RQ-PCR eingesetzt wird.

Mit allelspezifischen real-time PCR-Verfahren (ASO-RQ-PCR), welche klonale IgH VH-DH-JH-Umlagerungen oder die Translokation t(11;14) erfassen, kann der sensitive Nachweis von einer einzelnen Leukämie- oder Lymphomzelle vor einem polyklonalen Hintergrund von 10^5 B-Zellen erreicht werden (Brüggemann et al. 2000). Mit ASO-RQ-PCR ist es somit möglich, den Krankheitsverlauf eines Patienten spezifisch und quantitativ zu verfolgen, die Effektivität verschiedener Therapien zu dokumentieren und eine individuelle Therapiesteuerung durchzuführen (van Dongen et al. 2015; Pott 2011).

1.6 Limitationen der MRD-Diagnostik bei MCL

Durch PCR-basierte Techniken kann bei Verwendung der Zielgene IgH und t(11;14) lediglich in ca. 85% der Mantelzell-Lymphompatienten ein geeigneter molekularer Marker für die MRD-Diagnostik generiert werden. Die Translokation t(11;14), die sich mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bei etwa 95% der MCL-Fälle nachweisen lässt (Siebert et al. 1998), ist nur in ca. 30 % der Fälle über eine PCR nachweisbar (Williams et al. 1993). Da es sich bei der Translokation um einen ungeordneten Vorgang handelt, kommt es zu einer Streuung der Bruchpunkte innerhalb der Bruchpunktregion von ca. 360kb im Bereich des CCND1-Gens. Dieses Gen liegt auf Chromosom 11 und kodiert für das Zellzyklusprotein Cyclin D1. Der molekulargenetische Nachweis der Translokation konzentriert sich auf einen 85 bp-großen Bereich, den sogenannten major translocation cluster (MTC). In diesem liegen ca. 40% der Bruchpunkte (Pott et al. 1998). Zusätzlich konnten weitere, kleinere Cluster von Bruchpunkten identifiziert werden. Die gemessen an der Anzahl der Bruchpunkte umfangreichsten Cluster von diesen liegen ca. 20 kb bzw. ca. 100 kb vom MTC aus in Richtung Telomer und werden als minor translocation cluster 1 bzw. 2 bezeichnet (Rimokh et al. 1993; Rimokh et al. 1994).

Neben der Verfügbarkeit detektierbarer molekulargenetischer Marker kann eine zusätzliche Limitation der MRD-Diagnostik bei MCL auch eine mangelnde Konstanz des IgH-Markers durch somatische Hypermutation im Bereich des IgH-Genlocus sein. Diese kann die exakte Bindung von Primern oder Sonden beeinflussen bzw. verhindern und dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Aufgrund dieser Einschränkungen existieren nicht für alle MCL-Patienten zwei stabile und spezifische Targets für die MRD-Diagnostik. Die Etablierung eines weiteren Markers für die MRD-basierte Therapiesteuerung ist deshalb sinnvoll.

1.7 Immunglobulinleichtkette kappa als Marker der MRD-Diagnostik bei MCL

Neben dem Immunglobulinschwerkettengen und der Translokation t(11;14) sind weitere molekulare Marker bei Patienten mit MCL nachweisbar. So können klonale Rearrangements der Immunglobulinleichtkette kappa (Ig κ) ebenfalls in nahezu 100% nachgewiesen werden (Evans et al. 2007). Ähnlich den Umlagerungen im Immunglobulinschwerkettengen werden die Genabschnitte eines V κ -Segments mit einem J κ -Segment und einem konstanten Teil (C κ) des Ig κ rearrangiert. Es existieren insgesamt sieben V κ -Familien (V κ 1-7) und fünf J κ -Segmente (J κ 1-5). V κ 1, 2 und 3 bestehen aus mehreren Mitgliedern, V κ 4, 5 und 7 aus nur je einem Mitglied und V κ 6 aus zwei Mitgliedern (van Dongen et al. 2003).

Die Besonderheit bei der Rekombination von Ig κ ist, dass das kappa-Leichtkettengen ausgeschaltet wird, wenn während des Rearrangements keine informative Gensequenz entsteht. Zum Ausschalten wird entweder eine V κ -Region oder eine Intron/recombination signal sequence (Intron/RSS) im Intron, das distal der J κ -Segmente liegt, an das kappa deleting element (KDE) rekombiniert. Im ersten Fall gehen dadurch das komplette Genmaterial der J κ -Sequenzen, das Intron/RSS und die Gensequenzen des konstanten Teils (C κ) verloren. Im zweiten Fall bleibt die erfolglose Rekombination von V κ -J κ erhalten,

aber die Gensequenzen des konstanten Teils gehen verloren. In Abbildung 1 sind diese Abläufe schematisch dargestellt. Mögliche Ergebnisse der Rekombinationen im $Ig\kappa$ -Gen (und damit potentielle Ziele der molekulargenetischen Diagnostik) sind also $V\kappa$ - $J\kappa$ oder $V\kappa$ -KDE bzw. Intron/RSS-KDE (die KDE-Rekombinationen werden im Weiteren zusammengefasst als $Ig\kappa$ -KDE bezeichnet, die $J\kappa$ -Rekombinationen in Analogie dazu als $Ig\kappa$ - $J\kappa$). Unter Verwendung von sogenannten Konsensus-PCR-Primern, die an konservierte Sequenzen der $V\kappa$ - und $J\kappa$ -Segmente binden, können die Rekombinationen im $Ig\kappa$ -Gen mittels PCR nachgewiesen werden (Langerak et al. 2004; Langerak und van Dongen 2006; van Dongen et al. 2003). In Abbildung 2 ist die Lage der Primer für die $Ig\kappa$ -Konsensus-PCR dargestellt.

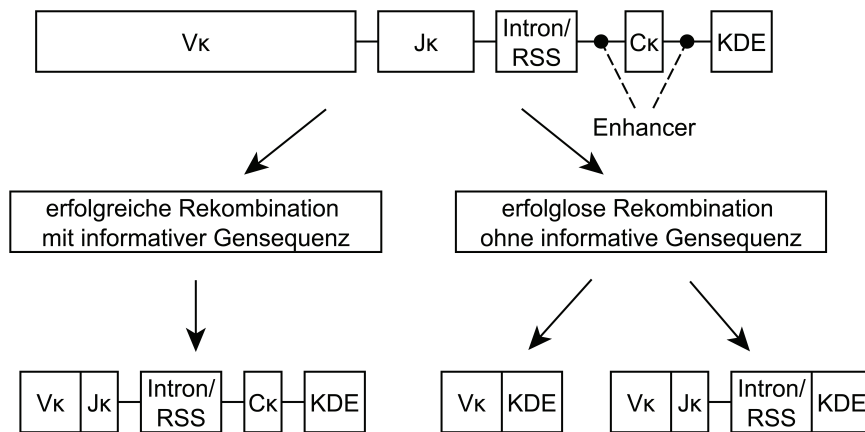


Abbildung 1: Schematische Darstellung der möglichen Rekombinationen im $Ig\kappa$ -Gen (vereinfacht nach Fig. 1 aus Langerak et al. 2004)

$Ig\kappa$ - Immunglobulinleichte Kette kappa, $V\kappa$ - Variable-Genregion, $J\kappa$ - Joining-Genregion, $C\kappa$ - konstante Genregion, KDE - kappa deleting element, RSS - recombination signal sequence.

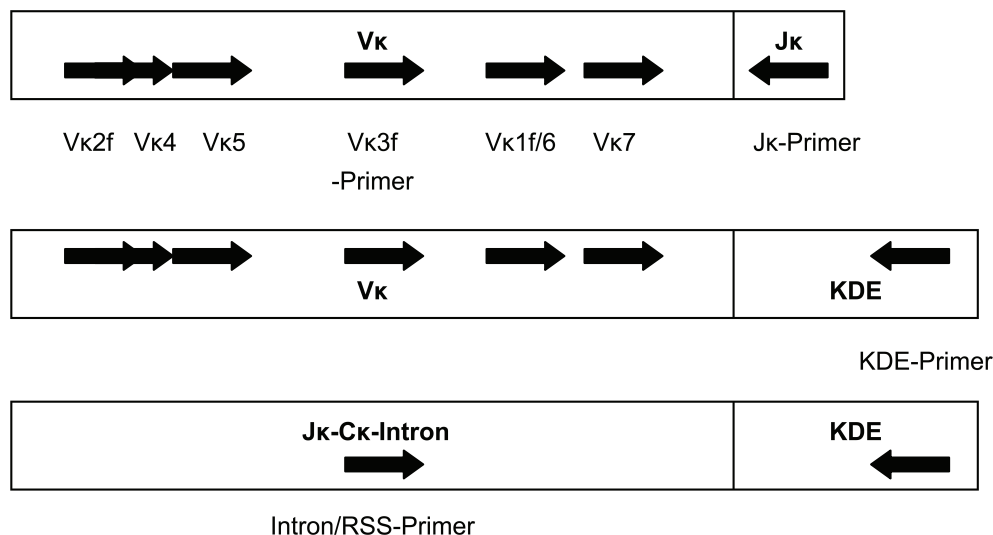


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ergebnisse der $Ig\kappa$ -Rekombinationen (vgl. Abb. 1) und Lage der Primer für die $Ig\kappa$ -Konsensus-PCR (nach Fig. 6b aus van Dongen et al. 2003). Für die Sequenzen der Primer siehe Tabelle 3 in Kapitel 2.3.1.3.

$Ig\kappa$ - Immunglobulinleichte Kette kappa, $V\kappa$ - Variable-Genregion, $J\kappa$ - Joining-Genregion, KDE - kappa deleting element, RSS - recombination signal sequence.

Von theoretischem Vorteil bei der Verwendung von Ig κ als MRD-Marker ist, dass von den beiden Leichtkettengenen das Immunglobulinleichtkettengen kappa zuerst rearrangiert wird. Nur wenn dieses Rearrangement ineffektiv bleibt und per Rekombination an KDE ausgeschaltet wird, folgt ein Rearrangement des Gens der Immunglobulinleichtkette lambda (Langerak und van Dongen 2006). Es ist deshalb anzunehmen, dass jedes MCL mindestens eine von der Keimbahnsequenz verschiedene und potentiell einmalige Veränderung im Ig κ -Gen aufweist, welche als genetischer Fingerabdruck der Lymphomzelle für eine MRD-Diagnostik genutzt werden kann. Dies kann entweder ein V κ -J κ -Rearrangement oder (im Falle einer erfolglosen Rekombination) ein V κ -, bzw. ein Intron/RSS-KDE-Rearrangement sein. Klonale Rearrangements der lambda-Leichtkette sind dagegen nur in etwa 40% der MCL nachweisbar (Evans et al. 2007).

Zusätzlich geht man davon aus, dass ein Ausschalten des Ig κ -Gens durch KDE-Rekombination und dadurch der Verlust der beiden Ig κ -Enhancer diesen Genort von weiteren somatischen Mutationen ausschließt. Die Enhancer liegen zwischen Intron/RSS und C κ bzw. C κ und KDE (siehe Abb. 1). Dies bedeutet einen potentiellen Vorteil für die Stabilität des molekularen Markers über einen langen Zeitraum aufgrund des Fehlens von somatischen Hypermutationen (van Dongen et al. 2003).

Aus den genannten Gründen erscheint es daher sinnvoll, klonale Rearrangements der Immunglobulinleichtkette kappa als zusätzlichen Marker für die MRD-Diagnostik bei MCL zu etablieren. Bei anderen B-Zell-Neoplasien werden klonale Rearrangements der Immunglobulinleichtkette kappa bereits erfolgreich als MRD-Marker genutzt. Zuerst zu nennen ist hierbei die ALL, bei der Ig κ neben IgH und im Falle einer Philadelphia-positiven-ALL auch der Translokation t(9;22) einen festen Stellenwert in der MRD-Diagnostik hat (van Dongen et al. 2015).

Die Eignung von Ig κ ist bei der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) ebenfalls untersucht worden und hat sich mit einigen Einschränkungen als möglich und sinnvoll herausgestellt (Henopp 2006). Auch für das Multiple Myelom liegen Daten für zur MRD-Diagnostik mit klonalen KDE-Rearrangements vor (Puig et al. 2012), ebenso für das pädiatrische Burkitt Lymphom (Lovisa et al. 2009).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem PCR-basierten Nachweis von Ig κ als klonalem Rearrangement bei MCL und dessen Eignung als MRD-Marker für diese Lymphomentität. Die konkreten Fragestellungen dieser Arbeit lauten:

1. Wie ist die Frequenz PCR-detektierbarer klonaler Ig κ -Rearrangements in Blut und/oder Knochenmark einer Kohorte von Patienten mit MCL?
2. Sind klonale Rearrangements von Ig κ grundsätzlich für die ASO-RQ-PCR basierte MRD-Diagnostik bei MCL geeignet?
3. Wie sensitiv und spezifisch kann mittels ASO-Ig κ -PCR der Nachweis von MRD bei MCL erfolgen?
4. Ist es durch die Nutzung des Ig κ möglich, den Anteil der molekulargenetisch quantifizierbaren MCL-Patienten zu erhöhen?
5. Welchen Beitrag können klonale Ig κ -Rearrangements in Zukunft in der MRD-Diagnostik von MCL leisten?

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial und Untersuchungsablauf

Untersucht wurde peripheres Blut (PB) und/oder Knochenmark (KM) von 85 Patienten mit histologisch gesichertem MCL, von denen 34 im Rahmen der Studie des Europäischen Mantelzell-Lymphom Netzwerks zur Behandlung älterer und 51 im Rahmen der Studie zur Behandlung jüngerer Patienten behandelt wurden (EUMCL-Studien). Von den 85 untersuchten Patienten waren 14 Frauen (16,5%) und 71 Männer (83,5%). Das mediane Erkrankungsalter der Frauen betrug 65 Jahre, der Männer 61 Jahre, insgesamt 62 Jahre.

Die Patienten hatten im Rahmen der Einverständniserklärung zur Studienteilnahme auch ihre Einwilligung zur Analyse von MRD und der Verwendung von Blut- und Knochenmarkproben zu diesem Zweck zugestimmt. Die Ethikvoten für die Studien wurden von der Ethikkommission in Kiel erteilt. Das Hämatologie Labor der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein ist das deutsche Referenzlabor für die MRD-Analyse im Rahmen der EUMCL-Studien.

Die Einschlusskriterien für beide Studien waren:

- Patienten mit histologisch gesichertem MCL,
- fortgeschrittenes Ann-Arbor-Stadium II-IV,
- keine Vorbehandlung.

Die Patienten, die älter als 65 Jahre oder älter als 60 Jahre und ungeeignet für eine Hochdosis-Chemotherapie waren, wurden im Rahmen der EUMCL-Studie für ältere Patienten behandelt.

2.1.1 EUMCL-Studie für ältere Patienten

Die EUMCL-Studie zur Behandlung älterer Patienten (älter als 65 Jahre oder ungeeignet für eine autologe Transplantation) ist eine prospektive, randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie des Europäischen Mantelzell-Lymphom Netzwerks zur Therapieoptimierung. Primäre Studienendpunkte sind die Bestimmung der Aktivität (Rate an kompletten Remissionen) von sechs Zyklen R-FC (s.u.) im Vergleich zu acht Zyklen R-CHOP (s.u.) bei älteren Patienten mit MCL sowie die Bestimmung der Wirksamkeit (progressionsfreies Überleben) einer Rituximab-Erhaltungstherapie im Vergleich zu einer Interferon-Erhaltungstherapie.

Der sekundäre Studienendpunkt ist das Gesamtüberleben nach Start bzw. Ende der initialen Therapie.

In der Studie zur Anwendung kommende Chemotherapieregime sind:

- R-CHOP: **R**ituximab, **C**yclophosphamid, **H**ydroxydaunorubicin (Doxorubicin), **V**incristin (**O**ncovin), **P**rednisolon,
- R-FC: **R**ituximab, **F**ludarabin, **C**yclophosphamid.

In dieser Studie erhielten die Patienten nach einer Randomisierung entweder eine Induktionschemotherapie bestehend aus acht Zyklen R-CHOP alle drei Wochen oder sechs Zyklen R-FC alle vier Wochen. Nach einer zweiten Randomisierung der Patienten, die unter Induktionschemotherapie

eine klinische Remission erreicht hatten, erhielten diese Patienten eine Erhaltungstherapie mit entweder Interferon-alpha (3x3 Millionen IU) bzw. PEG-Interferon (1 µg/kg) wöchentlich oder eine Erhaltungstherapie mit Rituximab (375 mg/m²) alle zwei Monate. Die Erhaltungstherapie wurde bis zum klinischen Rezidiv fortgeführt.

2.1.2 EUMCL-Studie für jüngere Patienten

Die EUMCL-Studie zur Behandlung jüngerer Patienten bis 65 Jahre ist eine prospektive, randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie des Europäischen Mantelzell-Lymphom Netzwerks zur Therapieoptimierung. Primärer Studienendpunkt ist die Bestimmung der Wirksamkeit (Zeit bis zum Therapieversagen) einer Therapie mit sechs Zyklen R-CHOP gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation im Vergleich zu einer Therapie mit jeweils drei alternierenden Zyklen von R-CHOP und R-DHAP (s.u.) gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (Konditionierung mit hochdosiertem Cytarabin) bei jüngeren Patienten mit MCL. Sekundäre Studienendpunkte sind die Rate der kompletten Remissionen, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben.

In der Studie zur Anwendung kommende Chemotherapieregime sind:

- R-CHOP: **R**ituximab, **C**yclophosphamid, **H**ydroxydaunorubicin (Doxorubicin), **V**incristin (**O**ncovin), **P**rednisolon,
- R-DHAP: **R**ituximab, **D**examethason, **H**ochdosis-**A**ra-C (Cytarabin), **C**isplatin,
- Dexa-BEAM: **D**examethason, **B**CNU (Carmustin), **E**toposid, **A**ra-C (Cytarabin), **M**elphalan.

Nach einer initialen Randomisierung in zwei Gruppen erhielt eine Gruppe der Patienten eine Induktionschemotherapie bestehend aus sechs Zyklen R-CHOP alle drei Wochen, gefolgt von einer Stammzellmobilisierung mittels Dexa-BEAM und Apherese der peripheren Blutstammzellen mit anschließender myeloablativer Radiochemotherapie und Reinfusion der autologen Blutstammzellen. Die andere Patientengruppe erhielt insgesamt sechs Zyklen R-CHOP bzw. R-DHAP im Wechsel mit anschließender Apherese der peripheren Blutstammzellen, gefolgt von einer myeloablativen Radiochemotherapie mit hochdosiertem Cytarabin und anschließender Reinfusion der autologen Blutstammzellen. Eine Erhaltungstherapie wurde bis zum klinischen Rezidiv nicht verabreicht.

2.1.3 Zeitpunkte der MRD-Diagnostik

Material zur MRD-Diagnostik (Knochenmark und/oder peripheres Blut) wurde zu folgenden Zeitpunkten im Hämatologie Labor in Kiel asserviert: Erstdiagnose, Zwischenstaging nach 3-4 Zyklen der Induktionschemotherapie, Restaging nach Komplettierung der Induktionstherapie (vier Wochen nach der letzten Gabe der Induktionschemotherapie) sowie bei den Follow-up-Untersuchungen, welche im Falle der jüngeren Patienten alle drei Monate nach der autologen Blutstammzelltransplantation, im Falle der älteren Patienten alle 2-3 Monate während der Erhaltungstherapie erfolgten.

2.1.4 Arbeitsablauf der Materialaufarbeitung und der Untersuchungsschritte

Die einzelnen Untersuchungsschritte dieser Arbeit sind in Abbildung 3 dargestellt und werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

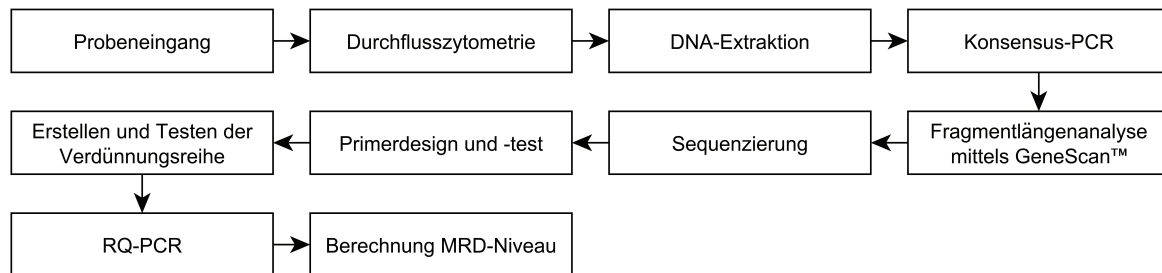


Abbildung 3: Abfolge der Untersuchungsschritte dieser Arbeit. Nach Probeneingang wurde der Anteil der MCL-Zellen (Infiltrationsgrad) mithilfe spezifischer MCL-Oberflächenmarker in der Durchflusszytometrie bestimmt. Anschließend erfolgten die DNA-Extraktion und die Konsensus-PCR zur Fragmentlängenanalyse/Klonalitätsanalyse mittels GeneScan™ sowie zur Sequenzierung. Die gewonnenen DNA-Sequenzen wurden analysiert und anschließend patientenspezifische Primer designed. Nach Testung der Primer, Erstellen und Testen der Verdünnungsreihe wurde die RQ-PCR mit den Verlaufs-Patientenproben durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen konnte dann das MRD-Niveau berechnet werden.

2.2 Materialaufarbeitung

2.2.1 Durchflusszytometrie

Das diagnostische Material wurde zunächst mittels 4-Farben Durchflusszytometrie auf den Anteil der MCL-Zellen untersucht (Infiltrationsgrad). Dieser Anteil an den Gesamtzellen des diagnostischen Materials wurde im Verlauf der Untersuchungen für die Erstellung der Verdünnungsreihe und die Berechnung des MRD-Niveaus genutzt. Das Färbeprotokoll für die durchflusszytometrische Untersuchung wurde von unserer Arbeitsgruppe publiziert und diente als Grundlage für alle durchflusszytometrischen Analysen. Markiert wurden dabei CD19, CD5, CD22 und CD23. Die MCL-Zellen wurden charakterisiert als $CD19^+CD5^+CD22^{low}CD23^{low}$ (Böttcher et al. 2008).

2.2.2 DNA-Extraktion aus EDTA-fixiertem Blut und Knochenmarkaspirat

Die DNA wurde direkt automatisch mit Hilfe des „Fujifilm Quickgene DNA Whole Blood Kit L“ nach Herstellerangaben extrahiert.

2.2.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe eines Mikro-Volumen Spektrophotometers (ND-1000, NanoDrop Technologies) wurde die DNA-Konzentration anhand der DNA-spezifischen Licht-Absorption bei 260nm gegen dH₂O als Referenz gemessen. Eine Einheit der Optischen Dichte entspricht hierbei einer dsDNA-Konzentration von 50µg/ml (Sambrook et al. 1989). Zudem wurde die Reinheit der Probe bestimmt, die sich aus dem Verhältnis der charakteristischen Absorption von DNA bei 260 nm zu 280 nm (proteinspezifisches

Absorptionsmaximum) ergibt. Bei einer Reinheit von $<1,8$ wurde die DNA-Probe einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterzogen und erneut gemessen. Eine Reinheit von 1,8 bis 2 wurde akzeptiert und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3 Klonalitätsanalyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Voraussetzung für die molekulargenetische Diagnostik in dieser Arbeit ist neben dem Anteil der MCL-Zellen im diagnostischen Material (Infiltrationsgrad) die Detektion der klonalen Expansion der Lymphomzellen im diagnostischen Material durch Klonalitätsanalyse. Letzteres geschieht über den Nachweis klonaler DNA-Sequenzen. Der Infiltrationsgrad wurde mittels Durchflusszytometrie anhand von spezifischen Oberflächenmarkern bestimmt.

Die für die DNA-Diagnostik notwendige Untersuchungsmethode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Auf ihr gründet auch die Untersuchung der Minimalen Resterkrankung. Es handelt sich bei der PCR um eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte, mit denen anschließend weitere Untersuchungen durchgeführt werden können. Das Prinzip beruht auf einer Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnitts, welcher von zwei der Reaktion hinzugegebenen Oligonukleotiden (Vorwärtsprimer (FP) und Rückwärtsprimer (RP)) flankiert wird. Die Primer binden aufgrund ihrer komplementären Nukleotidsequenz an möglichst spezifische Abschnitte der DNA-Matrize. Diese Primer werden von einer Polymerase entsprechend der Vorlage des komplementären DNA-Strangs verlängert. Während der Polymerasekettenreaktion werden verschiedene Phasen durchlaufen (Denaturierung, Annealing und Elongation). Die Besonderheit der Methode liegt darin, dass die hinzugegebene Polymerase thermostabil ist und während der PCR nicht denaturiert, wodurch der Prozess automatisierbar ist. Durch mehrfaches Durchlaufen der Phasen (Kettenreaktion) gelingt eine exponentielle Vervielfältigung des von den beiden Primern flankierten DNA-Abschnitts. Die PCR-Bedingungen in den Untersuchungen dieser Arbeit sind in den einzelnen Kapiteln dargelegt.

Das Ergebnis der Klonalitätsanalyse kann monoklonal, biallelisch-monoklonal oder klonal vor polyklonalem Hintergrund lauten. Lässt sich keine klonale Expansion nachweisen, so ergibt sich ein rein polyklonales Signal.

2.3.1 Konsensus-PCR für Immunglobulingenrearrangements

Konsensus-PCRs bieten eine einfache Möglichkeit, DNA-Proben unter anderem auf Klonalität zu untersuchen. Dabei werden Primer verwendet, die in hochkonservierten Bereichen der DNA binden und damit idealerweise bei allen Patientenproben eine PCR ermöglichen. Die Notwendigkeit, zuerst spezifische Primer zu generieren, entfällt damit.

Mittels Konsensus-PCRs lassen sich komplette VH-DH-JH-, inkomplette DH-JH-, V κ -J κ -, V κ -KDE- und Intron/RSS-KDE-Rearrangements erfassen. Es wurde eine IgH-Konsensus-PCR zum Nachweis der kompletten Rekombination des Gens der Immunglobulinschwerkette als VH-N-DH-N-JH und eine IgH-Konsensus-PCR zum Nachweis der inkompletten Rekombination des Gens der

Immunglobulinschwerkette als DH-N-JH durchgeführt. Die Ig κ -Konsensus-PCR wurde zum Nachweis des rekombinierten Gens der Immunglobulinleichtkette kappa als V κ -N-J κ bzw. die Ig κ -KDE-Konsensus-PCR zum Nachweis des rekombinierten Gens der Immunglobulinleichtkette kappa als V κ -N-KDE bzw. Intron/RSS-N-KDE verwendet (van der Velden et al. 2002; Beishuizen et al. 1997).

2.3.1.1 Komplette IgH VH-DH-JH-Umlagerungen

In der Praxis werden Konsensus-PCRs häufig als Multiplex-PCR durchgeführt. Dabei werden dem Reaktionsansatz verschiedene Konsensus-Primer zugegeben, ohne dass vorher bekannt ist, welche der Primer für die Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes genau erforderlich ist. Dadurch kann der Arbeitsaufwand deutlich reduziert werden. Zusätzlich werden eine Negativkontrolle ohne DNA und eine Positivkontrolle mit DNA, deren Amplifikation ein Fragment von bekannter Länge generiert, mitgetestet. Die IgH-Konsensus-PCR zur Detektion kompletter VH-DH-JH-Umlagerungen besteht, angelehnt an den Aufbau des VH-Teils des IgH-Gens, aus drei verschiedenen Reaktionsansätzen, die als Multiplex-PCR durchgeführt werden (IgH Tube A-C). Dabei binden die in Tube A enthaltenen Primer in der hochgradig konservierten framework region 1 (FR1), die Primer in Tube B und C entsprechend in FR2 bzw. FR3. Der Rückwärtsprimer ist in allen Reaktionsansätzen ein Konsensus-Primer, der in der JH-Region bindet (JH consensus). Dieser ist zur weiteren Verwendung der Amplifikate in der folgenden GeneScan™ Analyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Flourescein) markiert. Die Primersequenzen und die PCR-Reaktionsbedingungen entstammen dem BIOMED-Protokoll und sind in Tabelle 1 aufgeführt (van Dongen et al. 2003).

Tabelle 1: Primersequenzen IgH Tube A, B und C und Liste der Reagenzien.

| Reagenzien/Primer | | Menge/Ansatz | Sequenzen |
|-------------------|---------|--------------|-----------------------------------|
| IgH Tube A | VH1-FR1 | 10 pmol | 5 ' GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG 3 ' |
| | VH2-FR1 | 10 pmol | 5 ' GTCTGGTCTACGCTGGTCAAACCC 3 ' |
| | VH3-FR1 | 10 pmol | 5 ' CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG 3 ' |
| | VH4-FR1 | 10 pmol | 5 ' CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG 3 ' |
| | VH5-FR1 | 10 pmol | 5 ' CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT 3 ' |
| | VH6-FR1 | 10 pmol | 5 ' TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG 3 ' |
| IgH Tube B | VH1-FR2 | 10 pmol | 5 ' CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA 3 ' |
| | VH2-FR2 | 10 pmol | 5 ' TGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG 3 ' |
| | VH3-FR2 | 10 pmol | 5 ' GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA 3 ' |
| | VH4-FR2 | 10 pmol | 5 ' TGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG 3 ' |
| | VH5-FR2 | 10 pmol | 5 ' GGGTGCGCCAGATGCCCCGGGAAGG 3 ' |
| | VH6-FR2 | 10 pmol | 5 ' TGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG 3 ' |
| | VH7-FR2 | 10 pmol | 5 ' TTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA 3 ' |

| Reagenzien/Primer | | Menge/Ansatz | Sequenzen |
|--------------------|---------|--------------|-----------------------------------|
| IgH Tube C | VH1-FR3 | 10 pmol | 5 ' TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA 3 ' |
| | VH2-FR3 | 10 pmol | 5 ' CAATGACCAACATGGACCCTGTGGA 3 ' |
| | VH3-FR3 | 10 pmol | 5 ' TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC 3 ' |
| | VH4-FR3 | 10 pmol | 5 ' GAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACG 3 ' |
| | VH5-FR3 | 10 pmol | 5 ' CAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGC 3 ' |
| | VH6-FR3 | 10 pmol | 5 ' GTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTG 3 ' |
| | VH7-FR3 | 10 pmol | 5 ' CAGCACGGCATATCTGCAGATCAG 3 ' |
| JH consensus (FAM) | | 10 pmol | 3 ' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5 ' |
| 10x PCR-Puffer | | 5 µl | |
| MgCl ₂ | | 1,5 mM | |
| dNTP | | je 0,2 µM | |
| AmpliTaq Gold | | 1 U | |
| Genomische DNA | | 50-500 ng | |
| Aqua dest. | | ad 50 µl | |

Die PCR wurde mit einer Aktivierung der Polymerase von 10 Minuten bei 94°C gestartet. Anschließend folgten 35 Zyklen aus 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei 60°C und 30 Sekunden Elongation bei 72°C. Abschließend folgte die finale Elongation von 30 Minuten bei 72°C.

2.3.1.2 Inkomplette IgH DH-JH-Umlagerungen

Zur Detektion inkompletter DH-JH-Umlagerungen wurde eine vergleichbare Konsensus-PCR durchgeführt. Zum Nachweis dieses Rearrangements wurde eine Multiplex-PCR verwendet. Die Primer DH1-6 wurden gemeinsam in einer PCR verwendet; der DH7-Primer kam in einer eigenen PCR zum Einsatz. Der Grund hierfür liegt in der leichten Amplifikation von nicht rearrangierten Keimbahn-Allelen durch den Primer (van Dongen et al. 2003). Als Rückwärtsprimer wurde der bereits bekannte FAM-markierte JH consensus benutzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt und entstammen ebenfalls dem BIOMED-Protokoll. Die PCR-Bedingungen sind die gleichen wie in 2.3.1.1.

Tabelle 2: Primersequenzen IgH Tube D und E sowie JH consensus.

| Primer | | Sequenzen |
|------------|-----|-------------------------------|
| IgH Tube D | DH1 | 5 ' GGC GGAATGTGTGCAGGC 3 ' |
| | DH2 | 5 ' GCACTGGGCTCAGAGTCCTCT 3 ' |
| | DH3 | 5 ' GTGGCCCTGGGAATATAAAA 3 ' |
| | DH4 | 5 ' AGATCCCCAGGACGCAGCA 3 ' |
| | DH5 | 5 ' CAGGGGGACACTGTGCATGT 3 ' |
| | DH6 | 5 ' TGACCCCAGCAAGGGAAGG 3 ' |

| Primer | | Sequenzen |
|--------------------|-----|--------------------------------|
| IgH Tube E | | |
| | DH7 | 5 ' CACAGGCCCCCTACCAGC 3 ' |
| JH consensus (FAM) | | 3 ' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5 ' |

2.3.1.3 Ig κ -Umlagerungen

Von besonderem Interesse waren im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit klonale Umlagerungen des Immunglobulinleichtkettengens kappa, um diese auf ihre Eignung als Marker für MRD bei MCL zu untersuchen. Auch diese wurden mittels einer Konsensus-PCR im Multiplex-Ansatz detektiert. Die verwendeten Primer entstammen dem BIOMED-Protokoll und sind in Tabelle 3 aufgeführt; die PCR-Bedingungen sind die gleichen wie in 2.3.1.1. Als reverse Primer wurden entweder die FAM-markierten Primer J κ 1-4 und J κ 5, die im Bereich des J κ binden (Ig κ Tube A) oder ein FAM-markierter Primer, der im Bereich des kappa deleting element (KDE) bindet, genutzt (Ig κ Tube B).

Tabelle 3: Primersequenzen Ig κ Tube A und B.

| Primer | | Sequenzen |
|---|----------------------|--------------------------------------|
| Igκ Tube A und B | V κ 1/6 | 5 ' TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG 3 ' |
| | V κ 2f | 5 ' GGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTC 3 ' |
| | V κ 3f | 5 ' CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC 3 ' |
| | V κ 4 | 5 ' CAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGT TTT 3 ' |
| | V κ 5 | 5 ' CCTGCAAAGCCAGCCAAGACATTGAT 3 ' |
| | V κ 7 | 5 ' GACCGATTTACCCCTCACAATTAATCC 3 ' |
| Igκ Tube A | | |
| | J κ 1-4 (FAM) | 3 ' CCCTGGTTCCACCTCTAGTTTGCATTC 5 ' |
| | J κ 5 (FAM) | 3 ' CCCTGTGCTGACCTCTAATTTGCATTC 5 ' |
| Igκ Tube B | | |
| | Intron/RSS | 5 ' CGTGGCACCGCGAGCTGTAGAC 3 ' |
| | KDE (FAM) | 3 ' ATCCTGTTGGACGAGACTGGAGACTCC 5 ' |

2.3.2 Translokation t(11;14)

Zur Klonalitätsanalyse wurde ein in der eigenen Arbeitsgruppe erarbeiteter „semi-nested“-PCR-Assay verwendet (Pott et al. 1998). In diesem PCR-Ansatz wurde in der ersten PCR ein für Chromosom 11 spezifischer interner Primer in Kombination mit einem FAM-markierten JH-Konsensus-Primer als Rückwärtsprimer verwendet. In der zweiten PCR wurde ein für Chromosom 11 spezifischer externer Primer mit dem bereits zuvor verwendeten FAM-markierten JH-Konsensus-Primer verwendet (Primersequenzen und Reagenzien siehe Tabelle 4). Die Nachweisgrenze dieser PCR liegt bei einer von 10⁴ kernhaltigen Zellen.

Tabelle 4: Primersequenzen und Liste der Reagenzien für die PCR-Reaktionen der Klonalitätsanalyse von t(11;14).

| Reagenzien/Primer | | Menge / Ansatz | Sequenzen |
|-------------------|------------------------|----------------|--------------------------------|
| PCR 1 | Primer G | 20 pM | 5 ' GGAGCATAATTGCTGCACTGC 3 ' |
| | JH consensus (FAM) | 20 pM | 3 ' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5 ' |
| | Puffer (PCR-Puffer II) | 5 µl | |
| | MgCl ₂ | 4 µl | |
| | dNTP | je 0,2 µM | |
| | AmpliTaq Gold | 1 U | |
| | Genomische DNA | 500 ng | |
| PCR 2 | Aqua Merck | ad 48 µl | |
| | Primer B | 20 pM | 5 ' TTCGGTTAGACTGTGATTAGC 3 ' |
| | JH consensus (FAM) | 20 pM | 3 ' CCAGTGGCAGAGGAGTCCATTC 5 ' |
| | Puffer (PCR-Puffer II) | 5 µl | |
| | MgCl ₂ | 4 µl | |
| | dNTP | je 0,2 µM | |
| | AmpliTaq Gold | 1 U | |
| | DNA aus 1. PCR | 1,5 µl | |
| | Aqua Merck | ad 48 µl | |

Bei beiden Ansätzen wurde die PCR mit einer Aktivierung der Polymerase von 10 Minuten bei 94°C gestartet. Anschließend folgten 35 Zyklen aus 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C und 60 Sekunden Annealing bei 60°C. Abschließend folgte die finale Elongation von 5 Minuten bei 72°C.

Bei allen durchgeführten Konsensus-PCRs wurde als Positivkontrolle klonale DNA aus Zelllinien oder bekannter positiver Patienten-DNA, gemischte DNA von fünf gesunden Spendern als polyklonale Negativkontrolle (buffy coat - BC; Institut für Transfusionsmedizin des UKSH Campus Kiel) und deionisiertes Wasser (dH₂O) als Kontaminationskontrolle (no template control, NTC) amplifiziert.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Horizontale Agarosegelelektrophoresen dienen der analytischen Auftrennung und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten. Dabei erfolgt eine Größenauftrennung der Fragmente durch Wanderung entlang der angelegten Spannung durch die Eigenladung der Partikel. Die Wandergeschwindigkeit ist dabei abhängig von der angelegten Spannung und der Fragmentgröße. Durch Zugabe eines DNA-markierenden Fluoreszenzfarbstoffes können die resultierenden Banden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Materialien:

- PeqGold Universal Agarose (PeqLab),
- TBE (TRIS(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Borat-EDTA)-Puffer (pH 8): TRIS 89 mM, Borsäure 89 mM, EDTA 28 mM,
- GelRed™ (Biotium): 5 µl / 50 ml Gel,
- PCR-Marker (NEB),
- DNA-Längenstandard (Low DNA Mass Ladder, Applichem),
- Gel-Loading-Buffer bestehend aus: 5 ml Glycerin, 1 ml 10x TBE-Puffer, ad 10 ml Aqua bidest., Spatelspitze Bromphenolblau.

Für ein 2% Agarosegel wurden 8 g Agarose in 400 ml Aqua bidest. gelöst, erhitzt und das entstandene Gel im Wärmeschrank auf 60° abgekühlt. Nach Zugabe von 5 µl / 50 ml GelRed™ wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen, in der es bei Raumtemperatur auspolymerisierte. Mithilfe eines Kamms wurden beim Auspolymerisieren Geltaschen zum Einfügen von DNA-Proben gebildet. Das erhärtete Gel wurde dann in eine 1x-TBE-Puffer enthaltende Elektrophoresekammer transferiert. In die Geltaschen wurden 8-10 µl des PCR-Produktes zusammen mit je 2 µl des Gel-Loading-Buffers pipettiert. Parallel zu den Proben wurde 1 µl eines Längenstandards zusammen mit 2 µl des Gel-Loading-Buffers in eine gesonderte Geltasche pipettiert. Mit einem Elektrophorese-Spannungsgerät (Bio-Rad 200/2.0) wurde eine Spannung von 120-130 Volt für 20-30 Minuten angelegt. Danach konnten die Banden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und digital fotografiert werden (Bio-Rad Universal Hood II w/TLUM 100/240 Vac, ChemiDoc EQ Camera W/MZL).

2.4 Fragmentlängenanalyse mit GeneScan™ bzw. Heteroduplex-Gel

Das diagnostische Material wurde auf Klonalität untersucht. Dazu wurde die Fragmentlängenanalyse mit GeneScan™ bzw. die Auftrennung im Heteroduplex-Gel genutzt. Das Ziel war es, zu untersuchen, ob in dem diagnostischen Material klonale DNA-Sequenzen der Lymphomzellen nachweisbar waren.

2.4.1 Prinzip der GeneScan™-Analyse

Die in der Konsensus-PCR amplifizierten DNA-Fragmente waren durch die Nutzung eines fluoreszenzmarkierten Primers ebenfalls fluoreszenzmarkiert. Zur Markierung wurde der Farbstoff FAM genutzt. Zur weiteren Klonalitätsanalyse wurden die Amplifikate mit GeneScan™ analysiert. Dabei erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einer mit einem Polymer gefüllten Glaskapillare. Zum einen kann dadurch eine Differenzierung zwischen monoklonalen bzw. biallelisch-monoklonalen PCR-Produkten mit und ohne polyklonalem Hintergrund erfolgen. Zum anderen ist zusätzlich eine computergestützte Längenbestimmung der Amplifikate durch die simultane Elektrophorese eines Längenstandards möglich. Da der Längenstandard mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (ROX - 6-Carboxy-Rhodamin) markiert war, konnte er im selben Polymer wie die zu untersuchenden Amplifikate mitlaufen.

2.4.2 Klonalitätsanalyse von PCR-Produkten durch Fragmentanalyse (GeneScan™)

Durch die in hochkonservierten Regionen bindenden Konsensus-Primer wird die zwischen den Primern liegende Gensequenz amplifiziert. Diese ist abhängig von den an der Rekombination beteiligten Genen. Im Falle einer fehlenden klonalen Gensequenz oder falls die Konsensus-PCR keine klonale Sequenz amplifizieren kann, werden lediglich die polyklonalen Sequenzen amplifiziert. Der GeneScan™ zeigt dann eine annähernde Normalverteilung als Ausdruck der Polyklonalität (Abbildung 4). Die Untersuchung erfolgte in einem Kapillarsequenzerautomaten des Typs ABI 3100 (ABI, Weiterstadt).

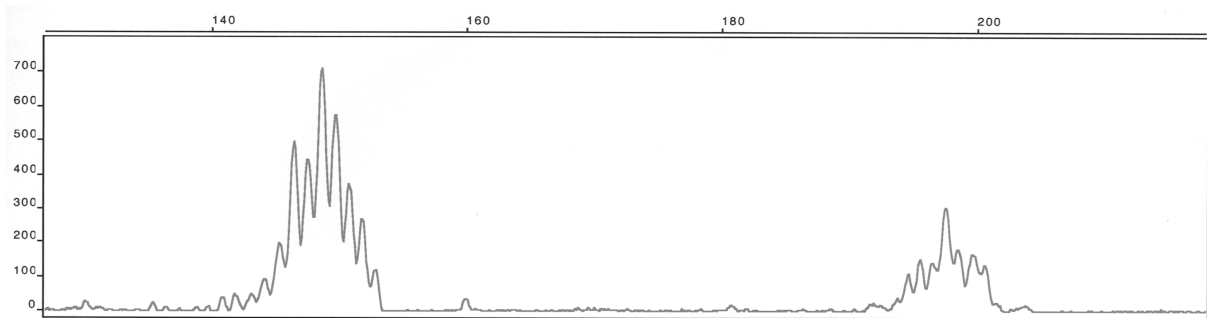
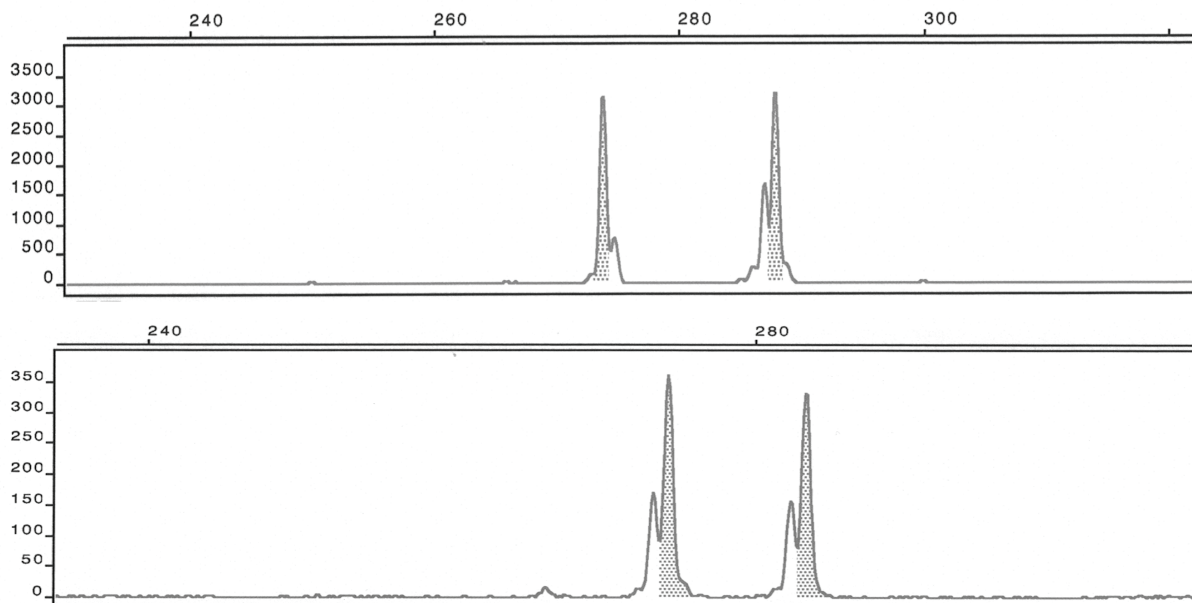


Abbildung 4: Verteilungsmuster polyklonaler Signale mit der GeneScan™ Analysis Software. Die bp-Länge ist auf der Abszisse gegen die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen. Es zeigen sich polyklonale Fragmente im Bereich von etwa 140 bis 150 bp sowie 190 bis 200 bp.



Abbildungen 5a und b: Verteilungsmuster klonaler Signale mit der GeneScan™ Analysis Software von einem Patienten für J κ - bzw. KDE-Rearrangements (5a: J κ , 5b: KDE). Die bp-Länge ist auf der Abszisse gegen die Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen. Es zeigen sich jeweils zwei klonale Signale für J κ (ca. 272 bp und 286 bp) sowie KDE (ca. 274 bp und 282 bp). Es handelt sich also um einen biallelisch-monoklonalen Fall.

Im Falle eines monoklonalen Signals im GeneScan™ wurde durch die Konsensus-PCR nahezu ausschließlich ein Amplifikat erzeugt. Im GeneScan™ zeigt sich ein isolierter Peak, der anhand des Längenstandards meist bereits einer bestimmten Genfamilie zugeordnet werden kann. Bei dem in Abbildung 5a und 5b gezeigten Fall handelt es sich um Daten, die von einem Patienten stammen. Dieser wies sowohl für Rearrangements mit Beteiligung von J κ als auch für solche mit Beteiligung von KDE jeweils zwei klonale Fragmente auf, was als biallelisch-monoklonal bezeichnet wird.

Möglich ist auch eine Mischform aus beiden Ergebnissen, die man dann als monoklonal vor polyklonalem Hintergrund bezeichnet. In diesem Fall wurde durch die Konsensus-PCR neben dem für die Lymphomzelle distinkten Amplifikat auch ein mehr oder weniger ausgeprägter polyklonaler Hintergrund in Form von Amplifikaten anderer Länge generiert.

2.4.3 Probenvorbereitung für die Elektrophorese

Vor Beginn der Untersuchung mussten 1 μ l des Amplifikats - je nach Signalstärke im Agarosegel verdünnt oder unverdünnt - in ein entsprechendes Tube gemeinsam mit 12 μ l Formamid und 0,5 μ l des internen Längenstandards ROX-500 aufgenommen werden. Direkt vor Einsetzen der Proben in das Gerät zur Fragmentlängenbestimmung wurden die Proben bei 92°C für 2 Minuten denaturiert und anschließend sofort kurz auf Eis inkubiert.

2.4.4 Auftrennung über Polyacrylamid-Gele: Prinzip der Heteroduplex-Analyse

Polyacrylamid-Gele werden zur elektrophoretischen Auftrennung u.a. von Nukleinsäuren genutzt. Dabei wird durch Polymerisation von Acrylamid ein Gel definierter Porengröße hergestellt. Nach Einbringung der aufzutrennenden Proben werden diese durch Anlegen einer Spannung aufgrund ihres unterschiedlichen Wanderungsverhaltens aufgetrennt.

Die Heteroduplex-Analyse gehört zu den Methoden der elektrophoretischen Auftrennung über Polyacrylamid-Gele. Sie ermöglicht es, klonale DNA-Fragmente von einem polyklonalen Hintergrund zu trennen. Dadurch kann zum einen eine Klonalitätsanalyse durchgeführt werden, zum anderen können die klonalen DNA-Fragmente anschließend weiter untersucht werden. Bei der Methode macht man sich das Wanderungsverhalten von doppelsträngiger DNA in einem elektrischen Feld zunutze. Doppelstränge aus zwei zueinander komplementären Strängen (Homoduplices) haben ein anderes Wanderungsverhalten als Doppelstränge aus zwei nicht-komplementären Strängen (Heteroduplices). Durch den Überschuss der Stränge monoklonaler DNA gegenüber den Strängen des polyklonalen Hintergrunds kommt es zu einer vermehrten Bildung von Homoduplices gegenüber der von Heteroduplices. Diese können dann in einer Gelelektrophorese voneinander getrennt werden. Die Homoduplices zeichnen sich dabei als scharfe Banden als im Gel sichtbares Korrelat zu den monoklonalen DNA-Fragmenten ab. Dagegen verteilen sich die Heteroduplices aufgrund ihres turbulenten Wanderungsverhaltens im Gel chaotisch und bilden keine scharfen Banden.

2.4.5 Erstellung von Homo-und Heteroduplices

Alle PCR-Produkte, die im GeneScan™ ein monoklonales Signal vor polyklonalem Hintergrund gezeigt hatten, wurden zur Vorbereitung der Sequenzierreaktion über ein Polyacrylamid-Gel mit dem Heteroduplexverfahren aufgetrennt. Die monoklonalen Banden wurden anschließend ausgeschnitten und weiter untersucht.

Zur Vorbereitung wurden die PCR-Produkte initial denaturiert (5 Minuten bei 95°C, 10 Minuten bei 4°C) und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Durch die Denaturierung wurden die DNA-Doppelstränge getrennt und konnten sich durch die anschließende abrupte Abkühlung nicht mit dem jeweils passenden Gegenstrang zusammenlagern. Stattdessen banden sie zufällig einen Gegenstrang und bildeten somit sowohl Homo- als auch Heteroduplices. Aufgrund des Überschusses von klonalen Strängen gegenüber dem polyklonalen Hintergrund gelang so die Isolierung der klonalen Fragmente im Heteroduplex-Gel.

Aus Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) sowie TBE-Puffer und Aqua dest. wurde ein Gel angemischt (Reagenzienliste siehe Tabelle 5). Das Gel wurde zwischen zwei saubere und fettfreie Glasplatten mit Abstand von 1,5 mm gegossen. Durch Einlage eines Kammes wurden Kammern zum Einbringen der Proben geschaffen. Anschließend wurde das Gel auspolymerisieren gelassen.

Tabelle 5: Reagenzienliste zur Herstellung eines Heteroduplex-Gels.

| Reagenzien | Menge/Gel |
|---------------|-----------|
| Aqua dest. | 30 ml |
| TBE | 2 ml |
| Polyacrylamid | 8 ml |
| APS | 200 µl |
| Temed | 40 µl |

Jeweils zwei vorbereitete Gele wurden in eine Gelelektrophoresekammer eingespannt, die dann mit 0,5x TBE-Puffer befüllt wurde. Die wie o.a. vorbereiteten PCR-Proben wurden mit je 5 µl HD-Laufpuffer (15 g Ficoll 400, 0,25 g Xylencyalol, Aqua dest. ad 100 ml) zum Überwachen der Elektrophorese unter sichtbarem Licht versetzt und komplett in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Tasche jedes Gels ein Längenstandard gegeben (Low Mass DNA Ladder, Invitrogen).

Die Elektrophorese wurde durch das Anlegen von 60V Spannung gestartet und nach 20 Stunden gestoppt. Die Glasplatten wurden getrennt und das auf der einen Glasplatte verbliebene Gel für 30 Minuten in eine Färbelösung gelegt (1 l 1x TBE mit 100 µl GelRed™). Die Auswertung des Gels erfolgte mit einer digitalen Bild-Dokumentation (Bio-Rad) unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 266 nm. Anschließend wurden die Banden auf einem UV-Tisch markiert. Jede markierte Bande wurde aus dem Gel geschnitten, in ein 1,5 ml Tube gegeben und mit Diffusionspuffer (5 ml 10M Ammonium-Acetat, 200 µl

EDTA (pH 8,0), Aqua dest. ad 100 ml) versetzt. Nach 24 Stunden Diffusion wurde der Inhalt des Tubes in eine mit Glaswolle gestopfte Säule gegeben und zentrifugiert. Die im Zentrifugat enthaltene DNA wurde über mehrere Waschschrte und Ethanolfällen gereinigt. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 25 µl TRIS-EDTA-Puffer resuspendiert und stand zur Sequenzierreaktion zur Verfügung.

2.5 Sequenzierung des B-Zell-Klons nach Sanger

In dieser Arbeit wurde die Sequenzierung nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger vorgenommen (Sanger et al. 1977). Hierfür wird eine PCR unter Hinzugabe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Neben den nicht markierten dNTPs werden auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs hinzugefügt. Hierbei ist jede Nukleotidart mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzmarker markiert. Nach Einbau eines ddNTP kann die PCR nicht fortgeführt werden, da die Polymerase keine Möglichkeit der Kettenverlängerung an dem Nukleotid mehr hat. Es entstehen im Rahmen der PCR also Amplifkate jeder möglichen Länge, welche jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff entsprechend des zuletzt eingebauten ddNTPs markiert sind. Werden diese Amplifkate dann in einem hochauflösenden Polymer mittels Elektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt und die Fluoreszenzfarbstoffe per Laser angeregt, so lässt sich daraus die DNA-Sequenz gewinnen.

2.5.1 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion

Ergab die Untersuchung im GeneScan™ ein monoklonales Signal, schloss sich direkt die Sequenzierung des B-Zell-Klons an. Theoretisch ist eine Weiternutzung der FAM-markierten Amplifkate, die für die GeneScan™-Analyse generiert wurden, als Ausgangsmaterial für die Sequenzierreaktion möglich. Aufgrund des starken Fluoreszenzsignals der Markierung ist es jedoch empfehlenswert, die Konsensus-PCR mit unmarkierten Primern zu wiederholen.

Vor Durchführung der Sequenzierreaktion müssen die so generierten Amplifkate zunächst aufgereinigt werden, um nicht mehr benötigte Primer, inkomplette PCR-Fragmente und dNTPs zu entfernen. Diese Aufreinigung geschieht über eine PCR-Aufreinigungsplatte Millipore Multiscreen-HTS-PCR (MSNU03010) sowie eine Unterdruck-Absaugvorrichtung (beides Firma Millipore). Hierfür wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz (50 µl) in ein Well einer PCR-Aufreinigungsplatte pipettiert. Anschließend wurden die zu entfernenden Bestandteile über eine Vakuumpumpe bei einem Unterdruck von min. 20 bis 25 mmHg maximal 10 Minuten abgesaugt. Danach wurde das auf der Membran zurückgebliebene gereinigte PCR-Produkt mit 25 µl Aqua dest. für 5-10 Minuten auf einem Schüttler eluiert und anschließend in frische Tubes pipettiert. Die DNA-Konzentration der für die Sequenzierreaktion vorgesehenen PCR-Amplifkate wurde mit NanoDrop bestimmt.

2.5.2 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung wurde das ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet (Tabelle 6). Für die Sequenzierung der über das Vakuum-System aufgereinigte Proben wurden je nach Konzentration des PCR-Produktes 1-2 µl in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Zur Sequenzierung der über Heteroduplex Gelelektrophorese gewonnen Amplifikate wurden 7 µl in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Für jedes Amplifikat wurde eine Sequenzierung mit Vorwärts- und Rückwärtsprimer durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden die bekannten Primer aus dem BIOMED-Protokoll verwendet (siehe Tabelle 3 in 2.3.1.3), bzw. für die Translokation t(11;14) Primer G und Primer B (siehe Tabelle 4 in 2.3.2).

Die PCR wurde mit einer initialen Denaturierung von 5 Minuten bei 96°C begonnen. Anschließend folgten 50 Zyklen bestehend aus jeweils zehn Sekunden Melting bei 96°C, fünf Sekunden Annealing bei 55°C und vier Minuten Elongation bei 60°C.

Tabelle 6: Zusammensetzung des verwendeten Sequenzierreaktionsansatzes.

| Reagenzien | Konzentration | Menge/Ansatz |
|------------------|---------------|---------------|
| BigDye | | 1 µl |
| Primer | 5 pmol/µl | 2 µl |
| Sequenzierpuffer | 5x | 7 µl |
| PCR-Produkt | 10-20 ng/µl | 1-2 bzw. 7 µl |
| Aqua dest. | | ad 20 µl |

2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte vor der Sequenzierung

Vor der Sequenzierung wurden die Ergebnisse der Sequenzierreaktionen über ein auf Sepharose basierendes System aufgereinigt, um die PCR-Produkte von den restlichen Bestandteilen der Sequenzierreaktion zu trennen. Hierfür wurden entsprechend der Anzahl der aufzureinigenden Proben die Wells einer Millipore Platte mit Sepharose befüllt. Pro Well wurden 300 µl Aqua dest. hinzugegeben. Bei Raumtemperatur wurde die Sepharose drei Stunden quellen gelassen, bzw. im Kühlschrank bei 4°C über Nacht. Das überschüssige Wasser wurde abzentrifugiert. Daraufhin wurde auf jede Sepharose-Säule der Inhalt einer Sequenzierreaktion gegeben und die Platte erneut zentrifugiert, wobei übriggebliebene Nukleotide und Primer gebunden wurden und die aufgereinigten Amplifikate in die Wells einer sauberen Platte gelangten. Die so aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden im Anschluss nach Zugabe von 5-10 µl HiDi-Formamid auf einem Kapillarsequenzerautomaten des Typs ABI 3100 (ABI, Weiterstadt) analysiert.

2.6 Mutationsanalyse der Immunglobulingenrearrangements

Die in der Sanger-Sequenzierung generierten Sequenzen wurden mit Hilfe der IMGT/V-Quest Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest) analysiert (Lefranc 2003). Die Gensequenzen der verwendeten V-, (D-), J-Familien sowie die Mutationsfrequenz wurden mit der hinterlegten Keimbahnsequenz der IMGT-Datenbank verglichen. Der Mutationsstatus wurde als prozentuale Abweichung von der nächsten vergleichbaren Keimbahnsequenz angegeben. Eine Sequenz wurde als unmutiert bewertet, wenn die Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz >98% betrug. Die Gensequenzen des kappa deleting element, des Introns bzw. der bei der Translokation t(11;14) genutzten Abschnitte auf Chromosom 11 wurden mit den entsprechenden Datenbank-Referenzsequenzen abgeglichen.

2.7 Quantifizierung des MRD-Niveaus mit real-time quantitative PCR (RQ-PCR)

Die Detektion der Minimalen Resterkrankung basiert auf der Quantifizierung residueller Tumorzellen. Zur Detektion mittels RQ-PCR wird eine potentiell einmalige DNA-Sequenz benötigt, die gleichsam als genetischer Fingerabdruck der klonal expandierten Tumorzelle dient. Zu dieser Sequenz wird ein patientenspezifisches Oligonukleotid erstellt. Dieses kann je nach Methode ein Primer (Vorwärts- oder Rückwärtsprimer) oder ein Reportermolekül (Sonde) sein. Die Quantifizierung beruht auf der Erstellung einer Verdünnungsreihe von diagnostischem Primärmaterial, dessen Infiltrationsgrad durch das Malignom durch z.B. Durchflusszytometrie bekannt ist. Aus den Ergebnissen der Verdünnungsreihe kann über die Generierung einer Regressionsgerade dann die Quantifizierung residueller Tumorzellen der Verlaufsmaterialien erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden patientenspezifische (ASO-)Primer über die N-Region von klonalen Rearrangements der Immunglobulinleichtkette kappa designed. Zum Reaktionsansatz gehören ein ASO-Primer, ein markerspezifischer Konsensus-Primer sowie eine Sonde. Die Sonde bindet im zu amplifizierenden Bereich. Zur Anwendung kommen zwei verschiedene Arten von Sonden. Die eine Sondenart trägt ein Chromophor am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden dieser Art sind am 5'-Ende mit FAM und am 3'-Ende mit TAMRA (Tetramethylrhodamin) markiert. Bei intakter Sonde wird kein Signal emittiert. Während der Elongationsphase der PCR kommt es zur hydrolytischen Spaltung der Sonde durch die 5'-3' Exonucleaseaktivität der Polymerase. Dadurch werden Chromophor und Quencher getrennt.

Die andere Art Sonden ist ebenfalls 5'-FAM-markiert. Am 3'-Ende trägt sie einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) sowie ein Molekül, was bei Bindung an die Zielsequenz mit der kleinen Furche der DNA interkaliert (MGB - minor groove binder). Diese Sonde durchläuft bei Bindung an die Zielsequenz eine Konformationsänderung, die Chromophor und Quencher trennt.

Wird die Probe nun mit Licht der spezifischen Anregungswellenlänge bestrahlt, emittiert das vom Quencher getrennte Chromophor bei beiden Arten von Sonden Licht in der Wellenlänge seines Emissionsspektrums. Hierdurch kann über die Sonde die Ziel-DNA-Sequenz detektiert werden. Dabei

kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz, die proportional zur Menge der Zielsequenz ist. Während der PCR wird nach jedem Zyklus die Intensität der Fluoreszenz gemessen und als Funktion des PCR-Zyklus dargestellt. Der Schwellenwert (threshold) wird dabei so gewählt, dass er im gut messbaren Teil der exponentiellen Kurve des Fluoreszenzsignals mit ausreichendem Abstand zum Hintergrundrauschen und zum Plateau der Kurve liegt. Das Hintergrundrauschen wird durch unspezifische Fluoreszenz verursacht, die bei Zunahme der Fluoreszenz durch die Amplifikate im Verlauf an Bedeutung verliert. Das Plateau hat seine Ursache in einer Sättigung des Fluoreszenzsignals bei hoher PCR-Produkt-Konzentration. Erreichen die Fluoreszenzkurven der diagnostischen Materialien den Schwellenwert, so wird die Anzahl der dafür benötigten PCR-Zyklen als cycle threshold (Ct) der jeweiligen Probe zugeordnet. Ein niedriger Ct-Wert entspricht also einem frühen Signal und damit einer höheren Konzentration der spezifischen DNA-Sequenz, ein hoher Ct-Wert entsprechend einer niedrigeren Konzentration. Proben ohne Amplifikation wird die maximale Anzahl der PCR-Zyklen der Untersuchung zugeordnet.

2.7.1 Design der patientenspezifischen Primer

Die durch die Sequenzierung gewonnenen Sequenzen wurden verwendet um patientenspezifische Primer zu erstellen. Es galten folgende Vorgaben:

- möglichst 1-3 Basen über die N-Region hinaus,
- möglichst kein GC am Ende der Primersequenz,
- GC-Gehalt 40-60%,
- Schmelztemperatur $\pm 2^{\circ}\text{C}$ um Schmelztemperatur des Primers der Gegenrichtung und etwa 10°C unter Schmelztemperatur der Sonde,
- möglichst kein Hairpin-Loop,
- Bindungsenergie von Primer und Sonde untereinander am 3'-Ende nicht über 3,5 kcal/mol.

Zum Design wurden die Programme BioEdit (Ibis Bioscience), PrimerExpress (Applied Biosystems) und OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc.) verwendet. Die Primer wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) hergestellt. Die Testung der Primerspezifität erfolgte mit einem Dreifachansatz gepoolter polyklonaler DNA von fünf gesunden Spendern (BC) als Negativkontrolle, einem Doppelansatz des klonalen Primärmaterials des Patienten als Positivkontrolle und einer Kontaminationskontrolle mit dH_2O .

Die Bindung der ASO-Primer ist aus verschiedenen Gründen nicht immer spezifisch für die Patientenproben, sodass es durch unspezifische Bindungen der Primer zur Amplifikation der polyklonalen Negativkontrolle kommen kann. Um diese unspezifischen Bindungen zu minimieren, kann die Annealing-/Elongationsphase der RQ-PCR bei höheren Temperaturen erfolgen. Die Optimierung der Annealing/Elongations-Temperaturen wurde während der Primertestung durchgeführt.

2.7.2 RQ-PCR-Ansatz

Die RQ-PCR wurde mit einer Aktivierung der Taq-Polymerase für 2 Minuten bei 50°C und 10 Minuten bei 95°C gestartet. Anschließend folgten 45 Zyklen aus jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C und 60 Sekunden Annealing/Elongation. Die Annealing-/Elongationstemperatur war bei der Albumin-RQ-PCR 58°C (siehe 2.7.4), für die restlichen hier genannten RQ-PCRs wurden 59°C, 61°C bzw. 63°C getestet und schließlich die Temperatur mit dem besten Ergebnis gewählt. Tabelle 7 zeigt den Reaktionsansatz der TaqMan-RQ-PCR.

Tabelle 7: TaqMan-RQ-PCR-Reaktionsansatz.

| Reagenzien | Stammkonzentration | Endkonzentration | Menge/Ansatz |
|---------------------------------|--------------------|------------------|--------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix | 5x | 1x | 12,5 µl |
| Vorwärtsprimer (FP) | 20 pmol/µl | 300 nm | 0,38 µl |
| Rückwärtsprimer (RP) | 20 pmol/µl | 300 nm | 0,38 µl |
| Sonde | 20 pmol/µl | 100 nm | 0,13 µl |
| BSA | | | 0,2 µl |
| genomische DNA | | | 500 ng |
| Aqua dest. | | | ad 25 µl |

Die Sequenzen der Primer und Sonden wurden bereits publiziert bzw. in der eigenen Arbeitsgruppe erarbeitet (van Dongen et al. 2003; van der Velden et al. 2002; Verhagen et al. 2000; Pongers-Willemse et al. 1999; Pongers-Willemse et al. 1998; Beishuizen et al. 1997).

Es existiert ein zweites System von Rückwärtsprimer und Sonde (KDE-Fischer), dessen Bindungsstellen weiter in 3'-Richtung liegen. Dies trägt der Tatsache Rechnung, dass es regelmäßig zu ausgedehnten Deletionen am Beginn der KDE-Sequenz kommt. Durch diese Deletionen ist ein ausreichender Abstand der Bindungsstelle des ASO-Primers zur Bindungsstelle der Sonde nicht mehr gegeben, bzw. ist die Bindungsstelle der Sonde ganz oder teilweise deletiert.

Die t(11;14)-RQ-PCR wurde ebenfalls als ASO-PCR durchgeführt, es galten die gleichen Kriterien für den ASO-Primer wie bei IgH und Igκ. Die N-Region des Bruchpunktes wurde auf Chromosom 11 identifiziert und als Grundlage für das Design des patientenspezifischen Primers verwendet (Pott et al. 1998). Da es sich bei der Translokation t(11;14) um eine Translokation mit dem IgH-Genlocus handelt, konnten für die RQ-PCR dieselben Sonden und reversen JH-Primer verwendet werden wie bei IgH.

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in den folgenden Tabellen 8 bis 10 aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer und Sonden der IgH-RQ-PCR.

| Orientierung | Markierung | Bezeichnung | Sequenz (5' nach 3') |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|
| reverse | keine | RQ JH1RP | CGCTATCCCCAGACAGCAGA |
| reverse | keine | RQ JH2RP | GGGCTGCAGTGGGACTCA |
| reverse | keine | RQ JH3RP | CAGAGAAAGGAGGCAGAAGGAAA |
| reverse | keine | RQ JH4RP | GAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGTG |
| reverse | keine | RQ JH5RP | TGGCAAGCTGAGTCTCCCTAA |
| reverse | keine | RQ JH6RP | GCAGAAAACAAAGGCCCTAGAGT |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ JH1/4/5Sonde | ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ JH2Sonde | CCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTC |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ JH3Sonde | CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ JH6Sonde | ACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG |

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer und Sonden der Ig κ -J κ -RQ-PCR.

| Orientierung | Markierung | Bezeichnung | Sequenz (5' nach 3') |
|---------------------|-------------------|------------------------|------------------------------|
| reverse | keine | RQ J κ 1RP | GATCACTTCATAGACACAGGGAACAG |
| reverse | keine | RQ J κ 2RP | AATCCACACAAAGGAACACAAAGTA |
| reverse | keine | RQ J κ 3RP | TCACAAAACCTGCACAAATGATACA |
| reverse | keine | RQ J κ 4RP | AATTGACCTGAGCTAATATCTCAAACAC |
| reverse | keine | RQ J κ 5RP | CCATCAGACCCAAATTTTCAGAAGAC |
| forward | 5'FAM/3'MGB-NFQ | RQ J κ 1Sonde | CTCACGTTTGATTTCCA |
| forward | 5'FAM/3'MGB-NFQ | RQ J κ 2/4Sonde | CTTACGTTTGATCTCCA |
| forward | 5'FAM/3'MGB-NFQ | RQ J κ 3Sonde | CTTACGTTTGATATCCAC |
| forward | 5'FAM/3'MGB-NFQ | RQ J κ 5Sonde | CTTACGTTTAAATCTCCA |

Tabelle 10: Liste der verwendeten Primer und Sonden der Ig κ -KDE-RQ-PCR.

| Orientierung | Markierung | Bezeichnung | Sequenz (5' nach 3') |
|---------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| reverse | keine | RQ KDE_RP | TGGATATGGCAAAAATGCAGC |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ Kde_Sonde | AGCCCAGGGCGACTCCTCATGA |
| reverse | keine | RQ KdeFisch.Sy_RP | ACAGACAGGTCCTCAGAGGTCAG |
| forward | 5'FAM/ 3'TAMRA | RQ KdeFisch.Sy_Sonde | TGCAGCTGCATTTTTTGCCATATCCAC |

2.7.3 Erstellen von Standardkurven für die RQ-PCR

Die Quantifizierung der Verlaufspuren eines Patienten erfolgte anhand einer Standardkurve, die durch eine Verdünnungsreihe der DNA des Primärmaterials mit bekannter Kopienzahl der patientenspezifischen Gensequenz des MCL hergestellt wurde. Grundlage der Berechnungen bildet die Arbeit von Jeffreys et al., nach der 500 ng DNA aus 75000 Zellen gewonnen werden (Jeffreys et al. 1988). Beim MCL sind primär Lymphknoten betroffen. Der Anteil von MCL-Zellen an allen kernhaltigen Zellen von peripherem Blut oder Knochenmark (Infiltrationsgrad) liegt in den meisten Fällen daher nicht bei 100%. Die Ermittlung der MCL-Zellzahl im Primärmaterial erfolgte mittels Durchflusszytometrie anhand des unter 2.2.1 beschriebenen Protokolls. Da die patientenspezifische Gensequenz pro MCL-Zelle einmal auftritt, entspricht die Anzahl der MCL-Zellen theoretisch auch der Anzahl der Kopien der patientenspezifischen Gensequenz. Bei einem Infiltrationsgrad von 100% entsprächen 500 ng DNA also 75000 Zellen bzw. 75000 Kopien der patientenspezifischen Gensequenz. Entsprechend des prozentualen Anteils der MCL-Zellen an allen kernhaltigen Zellen des Primärmaterials wurde die Kopienzahl der patientenspezifischen Gensequenz im Primärmaterial errechnet.

Die Verdünnungsreihe wurde ausgehend von der DNA-Kopienzahl des Primärmaterials in Konzentrationen von 10^{-1} , 10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} und 10^{-5} (bei 100% Infiltration entsprechend 75000; 7500; 750; 345; 75; 34,5; 7,5; 3,45; 0,75 DNA-Kopien) durch Verdünnung in einer Lösung von polyklonaler DNA (BC) hergestellt. Die polyklonale DNA simuliert hierbei den polyklonalen Hintergrund, der in Patientenproben durch die DNA anderer kernhaltiger Zellen entsteht. In jeder Verdünnungsstufe wurde die DNA-Menge durch die Hinzugabe von polyklonaler DNA auf 500 ng konstant gehalten.

Die Durchführung der RQ-PCR erfolgte mit einem Doppelansatz des Primärmaterials und der Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 5×10^{-3} , mit einem Dreifachansatz der restlichen Verdünnungsstufen, einem Sechsfachansatz polyklonaler Negativkontrolle (BC) und einer Kontaminationskontrolle mit dH_2O . Bei der Untersuchung von Patientenproben zu späteren Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs (Verlaufsmaterialien mit unbekannter Kopienzahl) wurden diese ebenfalls im Dreifachansatz getestet. Durch die Kenntnis der Kopienzahl des Primärmaterials und damit auch der davon ausgehenden Verdünnungsstufen lässt sich durch lineare Regression für die Verlaufsmaterialien eine Kopienzahl errechnen. Die Untersuchung wurde auf einem ABI 7700 bzw. 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI, Foster City, USA) durchgeführt.

Für die Analyse der MRD-Diagnostik wurden von der European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology (ESLHO) technische Qualitätskriterien veröffentlicht, die sog. Euro-MRD Kriterien (van der Velden et al. 2007). Unterschieden werden dabei der „quantitative Messbereich“ (quantitative range - QR) und die „Sensitivität“ des Assays.

Der QR des patientenspezifischen Assays ist definiert durch die niedrigste Verdünnungsstufe, die ein spezifisches Amplifikationssignal, wie an der Form der Amplifikationskurve ersichtlich, und eine gute Reproduzierbarkeit der Amplifikation erbringt (ΔCt aller Replikate $\leq 1,5$). Außerdem muss sie einen

Abstand von mindestens 3 Ct vom niedrigsten Ct-Wert der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes und einen definierten Abstand des mittleren Ct-Wertes der Replikate des Mehrfachansatzes vom mittleren Ct-Wert der vorangegangenen Verdünnungsstufe (2,6 bis 4,8 Ct bei 10er-Stufen; 0,5 bis 1,5 bei 2er-Stufen) aufweisen.

Die daraus resultierende Standardkurve muss mindestens drei Verdünnungsstufen und mindestens zwei Log₁₀-Stufen umfassen. Erforderlich sind eine Steigung von -3,1 bis -3,9 und ein Korrelationskoeffizient von mindestens 0,98. Sollte die RQ-PCR diese Anforderungen nicht erfüllen, sollen keine weiteren Untersuchungen mit diesem Assay durchgeführt werden.

Die Sensitivität des patientenspezifischen Assays ist definiert durch die niedrigste Verdünnungsstufe, die ein spezifisches Amplifikationssignal erbringt, wie an der Form der Amplifikationskurve ersichtlich, und in mindestens einem Ansatz eine Replikation erbringt (Δ Ct ist nicht relevant). Außerdem muss sie einen Abstand des niedrigsten Ct-Wertes des Mehrfachansatzes vom niedrigsten Ct-Wert der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes von mindestens 1 Ct und einen Abstand des niedrigsten Ct-Wertes des Mehrfachansatzes von der unverdünnten Probe (=Primärmaterial) von maximal 20 Ct aufweisen.

In der Praxis ist das Ziel ein Assay mit einer Sensitivität und idealerweise auch einem QR von $\leq 10^{-4}$ zu entwickeln, um eine ausreichend sensitive MRD-Diagnostik und einen Vergleich der Ergebnisse mit den anderen MRD-Markern zu ermöglichen. Im Falle einer Untersuchung mit zwei MRD-Markern kann davon jedoch zugunsten eines etwas höheren QR von 5×10^{-4} abgewichen werden, wenn die Sensitivität des Assays $\leq 10^{-4}$ ist.

Sensitivität und QR der ASO-PCR werden durch verschiedene Faktoren bestimmt. Einen großen Anteil hat die unspezifische Amplifikation polyklonaler B-Zellen, welche die Sensitivität und den QR der MRD-Analyse einschränken. Die unspezifische Amplifikation manifestiert sich dabei in einem frühen Ct des polyklonalen Hintergrundes, wodurch das spezifische Signal in der Tumorprobe nicht mehr sicher abgegrenzt werden kann.

2.7.4 Albuminstandard

Um Unterschiede in der Amplifizierbarkeit der verschiedenen Proben eines Patienten rechnerisch auszugleichen, wurde ein Kontrollgen jeder Probe als interne Referenz quantifiziert (Pongers-Willemse et al. 1998). Ursache solcher Unterschiede können beispielsweise Verunreinigungen oder fragmentierte DNA sein, die die spätere RQ-PCR mit ASO-Primern beeinflussen können. Die Kopienzahl des diagnostischen Materials wurde dann anhand der Kopienzahl des Kontrollgens normalisiert. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um das Gen für Albumin. Der Normbereich der Albuminkopienzahl beträgt 50.000 bis 115.000 Kopien. Tabelle 11 zeigt die Liste der Reagenzien für die Albumin-RQ-PCR.

Die RQ-PCR wurde mit einer Aktivierung der Taq-Polymerase für zwei Minuten bei 50°C und einer initialen Denaturierung für zehn Minuten bei 95°C gestartet. Anschließend folgten 50 Zyklen mit einer Denaturierung von neun Sekunden bei 95°C und Annealing/Elongation von einer Minute bei 58°C.

Tabelle 11: Primersequenzen und Liste der Reagenzien für die Albumin-RQ-PCR.

| Reagenzien | Menge/Ansatz | Sequenzen |
|----------------------|--------------|----------------------------------|
| Albumin FP | 7,5 pmol | 5' CTGGAAGTCGATGAAACATACGTT 3' |
| Albumin RP | 7,5 pmol | 5' CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATA 3' |
| Albumin TaqMan-Sonde | 5 pmol | 5' TGCTGAAACATTACCTTCCATGCAGA 3' |
| PCR-Puffer | 12,5 µl | |
| Genomische DNA | 500 ng | |
| Aqua dest. | ad 25 µl | |

2.7.5 Bestimmung des MRD-Niveaus

In der Auswertung der RQ-PCR wird zwischen dem quantitativen Messbereich (QR - quantitative range) und der Sensitivität des Assays unterschieden. Nur im QR der Verdünnungsreihe ist es möglich, die Kopienzahl der Verlaufsmaterialien zu quantifizieren. Proben, die im QR liegen, werden als MRD-positiv mit MRD-Niveau angegeben. Proben, die unterhalb des QR aber oberhalb der Sensitivität liegen, werden als „MRD-positiv < QR“ angegeben. Eine Quantifizierung ist hier nicht möglich (Details siehe 2.7.3). Proben, die unterhalb der Sensitivität liegen, werden als MRD-negativ angegeben.

Liegt das MRD-Niveau unterhalb des QR aber innerhalb des sensitiven Bereiches, so wird das MRD-Niveau als MRD „positiv < QR“ mit Maximal- und Mindest-MRD-Niveau angegeben. Das Maximal-MRD-Niveau entspricht der unteren Grenze des QR, das Mindest-MRD-Niveau einer log-Stufe unterhalb der Sensitivität. Liegt das MRD-Niveau unterhalb des sensitiven Bereiches, so wird das MRD-Niveau als „negativ“ mit einem MRD-Niveau kleiner als die Sensitivität angegeben.

2.8 Puffer, Lösungen und Medien, Chemikalien, Materialien und Geräte

In den Tabellen 12 bis 14 sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Medien, Chemikalien sowie Materialien und Geräte aufgeführt.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.

| Puffer, Lösungen, Medien | Inhaltsstoffe |
|-------------------------------|--|
| Rehydrationspuffer | 0,3 mol/l TRIS / Acetat pH 8,0, 0,1% SDS, 3,75% Glycerin |
| 10x TBE Puffer | 0,89 M TRIS Base, 0,89 M Borsäure, 28 mM EDTA |
| Aqua dest. / Aqua bidest. | |
| Heteroduplex Färbelösung | 1 l 1x TBE mit 100 µl GelRed™ |
| Heteroduplex Diffusionspuffer | 5 ml 10 M Ammonium-Acetat, 200 µl EDTA (pH 8,0), Aqua dest. ad 100 ml |
| Heteroduplex Laufpuffer | 15 g Ficoll 400, 0,25 g Xylencyalol, Aqua dest. ad 100 ml |

Tabelle 13: Liste der verwendeten Chemikalien.

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---------------------------------|
| PeqGold Universal Agarose | PeqLab |
| GelRed | Biotium |
| Ethidiumbromid | Merck |
| PCR Marker | NEB |
| Glycerin | Merck |
| Bromphenolblau | Sigma |
| AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 10x Puffer II, MgCl | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| POP 4 | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| ROX | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| BSA 5% | Thermo Fisher Scientific |
| 10x PCR Buffer II ohne MgCl ₂ | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| MgCl ₂ | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| dNTPs | Roth |
| Low DNA Mass Ladder | Invitrogen |
| Big Dye Terminator V. 1.1 | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Terminator Cycle Seq Ready Reaction with Ampli Taq® | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Fujifilm Quickgene DNA Whole Blood Kit L | Fuji |
| 5x Sequenzierungs-Puffer | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| RQ-PCR MasterMix Plus | Eurogentec |
| TaqMan Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| BCR MRD Mastermix | Roche |
| Acrylamid | Serva |
| APS | Roth |
| Temed | Roth |
| Bind Silane | Amersham Biosciences |
| Essigsäure | Merck |
| Ethanol | Merck |
| Natriumacetat | Merck |
| Ficoll 400 | Merck |
| Xylencyalol | Merck |
| Ammoniumacetat | Merck |
| EDTA | Merck |

Tabelle 14: Liste der verwendeten Materialien und Geräte.

| Bezeichnung | Geräte-/Materialienname | Hersteller |
|---------------------------|--|---|
| Sequenzierautomat | ABI Prism® Genetic Analyzer, Modell 3100 | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Sequenzierautomat | ABIPrism 310 | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Sequenzierautomat | ABIPrism 377 | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Drehschüttler | | Heidolph Instruments, Schwabach |
| DNA-Konzentrationsmessung | NanoDrop | Thermo Fisher Scientific |
| DNA-Extraktion | Automatischer DNA Extraktor QuickGene 610-L | AutoGen |
| Real-Time PCR System | 7900 HT Fast Real-Time PCR System | Thermo Fisher Scientific |
| Real-Time PCR System | 7700 Sequence Detector | Thermo Fisher Scientific |
| Elektrophoresekammer | Model B1A | Easycast Owl Separationsystems, Portsmouth |
| PCR-Aufreinigungsplatte | Millipore Multiscreen-HTS-PCR | Millipore |
| Filterstreifen Clean Gel | Electrode Strips | ETC |
| Kamera | Bio-Rad Universal Hood II w/TLUM 100/240 Vac, ChemiDoc EQ Camera W/MZL | Bio-Rad |
| Schüttler | Vibramax 100 | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Thermocycler | 9700 GeneAmp PCR Cycler | Applied Biosystems |
| Thermostatwasserbad | Haake F2 | Haake, Karlsruhe |
| Tischzentrifuge klein | Eppendorf Zentrifuge 5415 D | Eppendorf, Hamburg |
| Trafo Agarose | BioRAD Power Pac 300 | BioRAD, U.S.A |
| Trafo Clean Gel | Gibco BRL PS 9009 Programmable Electrophoresis Power Supply | Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe |
| UV-Lampe | Spectroline Model TC - 312 nm UV | Spectroline, Canada |
| UV-Spektralphotometer | Ultraspec 3000 | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Vortexer | Vortex-Genie | Scientific Industries, U.S.A. |
| Wasserbad | Julabo SW-20 C | EYDAM, Seelbach |
| Zentrifuge | Megafuge 1.0 | Heraeus Instruments, Düsseldorf |
| Zentrifuge | Allegra 21 R Zentrifuge | Beckmann, Krefeld |
| TaqMan Pipettierplatten | 96 Well Platten | Applied Biosystems, Weiterstadt |
| | Optical Cohesive Covers | Applied Biosystems, Weiterstadt |

2.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit IBM SPSS Statistics 20 (IBM Microsystems) durchgeführt. Zur Visualisierung von Daten wurde die Darstellung als Box-Whisker-Plot gewählt.

Untersuchungen auf Signifikanz wurden für nicht-parametrische Daten aus zwei unverbundenen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test, bzw. für mehrere unverbundene Stichproben mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Anschließende Post-hoc-Tests wurden als paarweise Vergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test vorgenommen. Die Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung erfolgte nach Dunn-Bonferroni.

Für nicht-parametrische Daten aus zwei verbundenen Stichproben wurden Untersuchungen auf Signifikanz mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$) durchgeführt.

Auf einfache lineare Regression wurde mittels F -Test untersucht, teilweise nach vorhergehender logarithmischer Transformation der Daten.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, klonale Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa hinsichtlich ihrer Frequenz und Eignung als MRD-Marker für das MCL zu untersuchen. Hierfür wurde ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv von 85 Patienten aus den europäischen MCL-Studien ausgewählt. Die 85 Patienten wiesen entweder ein klonales IgH-Rearrangement (17 Patienten), eine PCR detektierbare Translokation t(11;14) (12 Patienten) oder beide klonalen Rearrangements als MRD-Marker (50 Patienten) auf. Bei sechs weiteren Patienten konnte keiner dieser beiden MRD-Marker nachgewiesen werden.

In den diagnostischen Proben der 85 Patienten wurde mittels Konsensus-PCR die Frequenz klonaler Ig κ -Rearrangements bestimmt. Die Gensequenzen der Ig κ -J κ -, bzw. Ig κ -KDE-Rekombinationen mitsamt der N-Region wurden identifiziert und patientenspezifische ASO-Primer generiert. Nach Testung der Primer mittels Verdünnungsreihe wurde schließlich eine ASO RQ-PCR zur Quantifizierung der minimalen Resterkrankung vorgenommen.

Die Erhebung der Ergebnisse der Immunglobulinschwerkette und der Translokation t(11;14) waren überwiegend nicht Bestandteil dieser Arbeit. Diese Ergebnisse waren zum Großteil bereits aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe bekannt und wurden in dieser Arbeit zu Vergleichszwecken herangezogen.

3.1 Nachweis der Klonalität mittels Konsensus-PCR und GeneScan™

Die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse mittels Konsensus-PCR und GeneScan™ aller 85 Patienten für die drei Genloci IgH, t(11;14) und Ig κ sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Klonale Ig κ -Rearrangements ließen sich mit vergleichbarer Häufigkeit wie klonale IgH-Rearrangements oder die Translokation t(11;14) in der Patientenkohorte nachweisen (Ig κ 73%, IgH 82%, t(11;14) 73%). Aufgrund der Selektion der Fälle lag die Frequenz der Translokation t(11;14) in der hier untersuchten Kohorte bei 73%, obwohl sie im Allgemeinen nur in 30% über PCR nachweisbar ist. Bereits die Kombination von zwei Markern erbrachte für mindestens 94% der Patienten mindestens ein klonales Signal. Durch die Hinzunahme des dritten Markers zeigten nahezu alle Patienten mindestens ein klonales Signal (99%).

Zwei klonale Signale zeigten über 60% der Patienten bei Kombination von IgH und t(11;14) bzw. IgH und Ig κ . Die Kombination aus t(11;14) und Ig κ erbrachte in ca. der Hälfte der Fälle zwei klonale Signale. Ein Patient lieferte in allen drei Genloci ein polyklonales Signal.

Tabelle 15: Ergebnis der Klonalitätsuntersuchung der Genloci IgH, t(11;14) und Ig κ .

| Marker (-kombi- nationen) | IgH | t(11;14) | Ig κ | IgH oder Ig κ | IgH oder t(11;14) | Ig κ oder t(11;14) | IgH und Ig κ | IgH und t(11;14) | Ig κ und t(11;14) | alle drei Marker |
|---|-------------|-------------|-------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| Anzahl Patienten (gesamt n=85) | 70 (82%) | 62 (73%) | 62 (73%) | 80 (94%) | 80 (94%) | 83 (98%) | 55 (65%) | 56 (66%) | 42 (49%) | 84 (99%) |

Dank der besonderen Eigenschaft des Ig κ -Genlocus in Bezug auf das Rearrangement lassen sich theoretisch bis zu vier klonale Signalen pro Patient nachweisen. Dies liegt daran, dass im Rahmen der Rekombination von Ig κ pro Allel sowohl ein V κ -J κ - als auch ein V κ - bzw. Intron/RSS-KDE-Rearrangement entstehen kann. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für die 62 Patienten aufgeschlüsselt, die mindestens ein klonales Signal in Bezug auf den Ig κ -Genlocus gezeigt hatten. Knapp die Hälfte dieser Patienten wies ein klonales Signal auf, die restlichen Patienten mindestens zwei.

Tabelle 16: Anzahl der klonalen Ig κ -Signale pro Patient mit Ig κ -Rearrangement.

| | Anzahl klonaler Ig κ -Rearrangements pro Patient | | |
|------|---|----------|---------|
| | 1 | 2 | >2 |
| n=62 | 29 (47%) | 25 (40%) | 8 (13%) |

3.2 Ergebnisse der Sequenzierung

Die Proben der 62 Patienten, die in der GeneScanTM-Untersuchung mindestens ein klonales Ig κ -Signal geliefert hatten, wurden sequenziert. Bei elf der Patienten mit Ig κ -J κ -Rekombination und acht mit Ig κ -KDE-Rekombination ließ sich trotz klonalem Ergebnis im GeneScanTM und Auftrennung im Heteroduplex-Gel mangels einer klonalen Bande keine Gensequenz gewinnen bzw. war das Sequenzierungsergebnis zu schlecht für die Identifizierung der N-Region. Da teilweise für das jeweils andere Ig κ -Rearrangement eine Sequenz generiert werden konnte, blieben lediglich sechs der 62 Patienten ohne eine geeignete Ig κ -Gensequenz für das Primerdesign für die RQ-PCR.

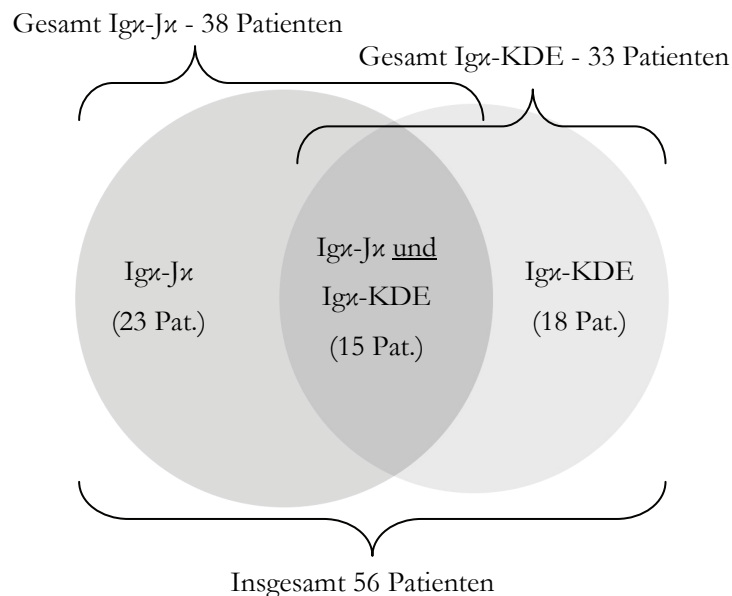


Abbildung 6: Diagramm zur Verdeutlichung der Verteilung der Patienten auf die beiden Ig κ -Marker. Ig κ - Immunglobulinleichte Kette kappa, J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichte Kette kappa, KDE - kappa deleting element.

Von den 56 Patienten mit einer informativen Gensequenz zeigten 38 Patienten ein Ig κ -J κ -Rearrangement und 33 Patienten ein Ig κ -KDE-Rearrangement. Dabei ließ sich bei 23 Patienten ein alleiniges Ig κ -J κ -Rearrangement, bei 18 Patienten ein alleiniges Ig κ -KDE-Rearrangement und bei 15 Patienten beide Rearrangements als Marker für die RQ-PCR identifizieren (Abbildung 6).

Die weiteren Ergebnisse beziehen sich nun auf die 56 Patienten, von denen mindestens eine informative Sequenz bezüglich des Ig κ -Genlocus identifiziert werden konnte (38 Patienten mit Ig κ -J κ - und 33 Patienten mit Ig κ -KDE-Rearrangement).

Aufgrund des Aufbaus des Genlocus des Immunglobulinleichtkettengens kappa und der Vorgänge bei der Rekombination kann eine Tumorzelle wie erwähnt bis zu vier klonale Rearrangements dieses Gens aufweisen (zwei Allele mit jeweils einer Ig κ -J κ - und einer Ig κ -KDE-Rekombination). Entsprechend wurden in dieser Arbeit klonale Sequenzen sowohl als monoklonale als auch als biallelisch-monoklonale Sequenzen identifiziert. Die genaue Verteilung gibt Tabelle 17 wieder.

Tabelle 17: Anzahl der monoklonalen bzw. biallelisch-monoklonalen Sequenzen für die klonalen Rearrangements Ig κ -J κ und Ig κ -KDE der Ig κ -Leichtkette.

| | Ig κ -J κ | Ig κ -KDE | Total |
|--------------------------|-------------------------|------------------|-------|
| monoklonal | 34 | 23 | 57 |
| biallelisch-monoklonal | 8 | 20 | 28 |
| Gesamtzahl der Sequenzen | 42 | 43 | 85 |

Insgesamt konnten bei 56 Patienten 85 Gensequenzen des Immunglobulinleichtkettengens kappa identifiziert werden (42 Ig κ -J κ - und 43 Ig κ -KDE-Gensequenzen, die Gensequenzen befinden sich im Anhang unter 7.1 und 7.2). Konnten von einem Patienten die Sequenzen beider Allele ermittelt werden, so werden diese durch die Suffixe „a“ oder „b“ unterschieden.

Durch die Identifikation von Ig κ -Sequenzen als MRD-Marker konnte die Anzahl von Patienten mit mindestens zwei MRD-Markern von 50 der 85 Patienten (59%) auf 66 Patienten (78%) erhöht werden. Bei den sechs Patienten, die noch über keinen MRD-Marker verfügten, konnte ein zusätzlicher Marker über die Analyse von Ig κ jedoch nur in zwei Fällen gewonnen werden. Damit blieben weiterhin vier Patienten ohne MRD-Marker (Tabelle 20). Bei 24 Patienten konnten insgesamt drei MRD-Marker identifiziert werden. Die folgenden Tabellen 18 bis 20 zeigen die möglichen Markerkombinationen für das untersuchte Patientenkollektiv vor bzw. nach Analyse von Ig κ . Bei den vier Patienten ohne jeden klonalen Marker in Tabelle 19 bzw. 20 handelt es sich um einen Patienten mit einem polyklonalen Signal in der GeneScan™-Analyse und drei Patienten ohne informative Gensequenz in der Untersuchung auf Ig κ -Rearrangements.

Tabelle 18: Anzahl der Patienten pro Marker(-kombination) vor Untersuchung auf Ig κ -Rearrangements.

| n | nur IgH | nur t(11;14) | IgH und t(11;14) | kein Marker |
|----|---------|--------------|------------------|-------------|
| 85 | 17 | 12 | 50 | 6 |

Tabelle 19: Anzahl der Patienten pro Marker(-kombination) nach Hinzunahme der Ergebnisse dieser Arbeit.

| n | nur Ig κ | nur IgH | nur t(11;14) | IgH und Ig κ | t(11;14) und Ig κ | IgH und t(11;14) | IgH, t(11;14) und Ig κ | kein Marker |
|----|-----------------|---------|--------------|---------------------|--------------------------|------------------|-------------------------------|-------------|
| 85 | 2 | 7 | 6 | 10 | 6 | 26 | 24 | 4 |

Tabelle 20: Veränderung der Anzahl von Patienten mit keinem, einem oder mindestens zwei MRD-Markern durch die Hinzunahme von Ig κ (Anzahl der Patienten gesamt n=85).

| | kein MRD-Marker | ein MRD-Marker | mind. zwei MRD-Marker |
|---------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------|
| vor Hinzunahme von Ig κ | 6 | 29 | 50 |
| nach Hinzunahme von Ig κ | 4 | 15 | 66 |

3.3 Struktur der Ig κ -Gensequenzen

Die über die IMGT-Datenbank analysierten Ig κ -Sequenzen erwiesen sich mit einer mittleren Mutationsfrequenz von 0,28% als überwiegend unmutiert. Dabei betrug die Mutationsfrequenz bei Ig κ -J κ 0,42% und bei Ig κ -KDE 0,14%. Die detaillierte Auflistung der Sequenzen inklusive Informationen über Mutationen und Deletionen befindet sich im Anhang (Tabellen A und B in Kapitel 7.1 bzw. 7.2).

Bei der Analyse der Ig κ -J κ -Rearrangements wurden die genutzten Gene von V κ sowie J κ , bei den Ig κ -KDE-Rearrangements von V κ identifiziert. Die Auswertung der Gensequenzen der Ig κ -J κ -Rearrangements zeigt eine präferentielle Verwendung von V κ 1 in beinahe 60% der Sequenzen. V κ 2-4 wurden mit 10-20% genutzt, V κ 5-7 wurden in den Ig κ -J κ -Rearrangements nicht gefunden. Bei den V κ -KDE-Rearrangements wurden V κ 1 und V κ 2 etwa gleich häufig mit ca. 20%, V κ 3 mit ca. 10%, V κ 4 und V κ 7 nur sporadisch (max. 2,3%), V κ 5 und V κ 6 überhaupt nicht nachgewiesen (Abbildung 7). Etwa die Hälfte der Ig κ -KDE-Sequenzen (20 von 43) wiesen ein Intron/RSS-Rearrangement auf. Die Ungleichverteilung in der Nutzung der V κ -Gensequenzen weist auf einen selektierten Prozess bei der Rekombination hin.

Die Verteilung der J κ -Familien zeigt eine Bevorzugung von J κ 2 mit knapp 35%, gefolgt von J κ 4 mit gut 25% sowie J κ 1 und J κ 5 mit jeweils knapp 20%. J κ 3 wurde nur in einer einzigen Gensequenz gefunden (Abbildung 8). Auch die Ergebnisse für J κ weisen auf einen selektierten Prozess bei der Rekombination hin.

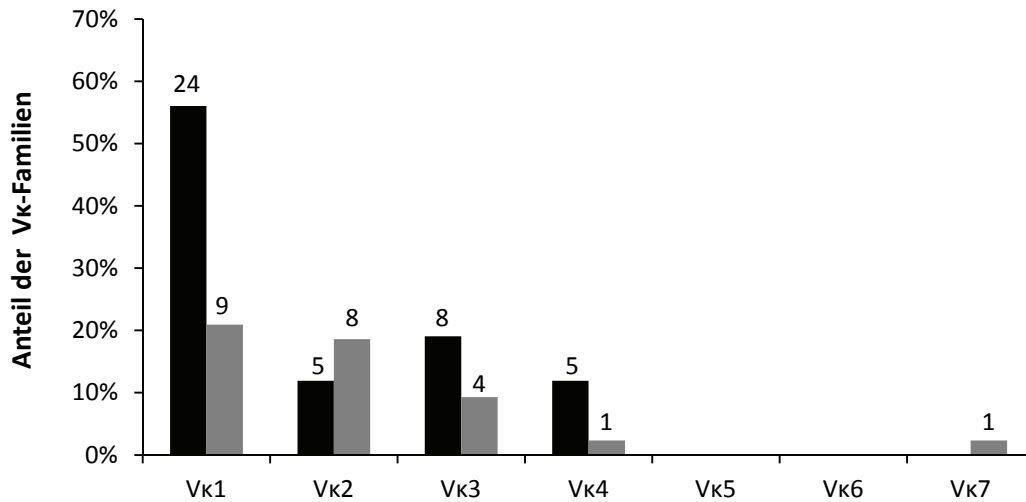


Abbildung 7: relative und absolute Verteilung der Vκ-Familien in den Proben der 56 Patienten mit mindestens einer informativen Gensequenz. Die absoluten Zahlen sind an den Balken angegeben. Ergebnisse für Vκ-Jκ schwarz, für Vκ-KDE grau.

Bei Vκ-Jκ zeigt sich eine überwiegende Nutzung von Vκ1, gefolgt von Vκ3 und Vκ2 und Vκ4. Bei Vκ-KDE wurden vorwiegend Vκ1 und Vκ2 genutzt, gefolgt von Vκ3 und Vκ4 und Vκ7. Vκ5 und Vκ6 wurden in dieser Untersuchung nicht gefunden.

Vκ - Variable-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

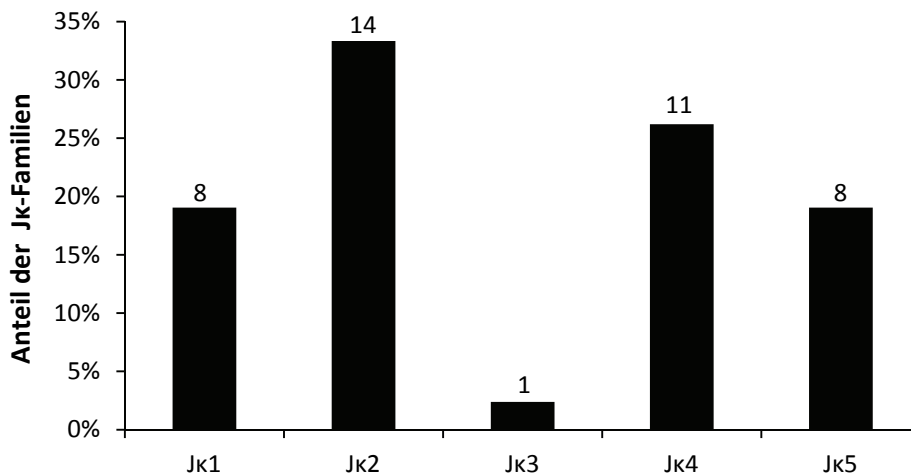


Abbildung 8: relative und absolute Verteilung der Jκ-Familien der 38 Patienten mit informativer Gensequenz des Igκ-Jκ-Rearrangements. Die absoluten Zahlen sind an den Balken angegeben.

Es zeigt sich eine präferentielle Nutzung von Jκ2 zu Jκ4 und Jκ1 bzw. Jκ5. Die Nutzung von Jκ3 wurde nur in einem Fall beobachtet.

Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa.

Für die Generierung allel-spezifischer Primer zur MRD-Quantifizierung ist die Identifizierung der klonspezifischen N-Region erforderlich. Die Länge der N-Region beeinflusst u.a. die Spezifität eines allelspezifischen Primers. Daher wurden alle Igκ-Sequenzen auf Deletionen an den Rekombinationsstellen sowie die Anzahl der eingefügten Nukleotide (Länge der N-Region) untersucht. Wiesen bei einem Patienten beide Allele eine N-Region auf, so gingen auch beide in die Auswertung ein.

Von den 42 Gensequenzen mit einem Ig κ -J κ -Rearrangement wiesen 22 keine N-Region auf. Bei den 20 Gensequenzen mit einer N-Region betrug die mittlere Länge der N-Region 3,5 bp, der Median lag bei 2 bp. 31 der 43 Gensequenzen mit einem Ig κ -KDE-Rearrangement - eine deutlich höhere Anzahl im Vergleich zu den Ig κ -J κ -Rearrangements - wiesen eine N-Region auf. Bei den 31 Gensequenzen mit N-Region betrug die mittlere Länge der N-Region 2,9 bp, der Median lag bei 2 bp. Die verschiedenen Ig κ -Rearrangements unterschieden sich nicht hinsichtlich der Länge der N-Region (asymptotischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $z=-0,837$, $p=0,403$, $n=42$).

Neben der Länge der N-Region sind auch das Vorhandensein und die Anzahl von Deletionen an der Rekombinationsstelle von Interesse. Auch durch diese wird die Spezifität des allelspezifischen Primers beeinflusst. Es ist dabei anzunehmen, dass ausgedehntere Deletionen die Unterschiedlichkeit der rekombinierten Gensequenz von der Keimbahnsequenz erhöhen. Bei den insgesamt 42 Sequenzen mit Ig κ -J κ -Rearrangement betrug die Deletion am V κ im Mittel 2,5 bp, die Deletion am J κ im Mittel 1,5 bp. Bei den insgesamt 43 Sequenzen mit Ig κ -KDE-Rearrangement betrug die Deletion am V κ bzw. Intron/RSS im Mittel 2,8 bp, die Deletion am KDE im Mittel 4,1 bp. Dabei unterschied sich die Anzahl der Deletionen signifikant zwischen denen am J κ des Ig κ -J κ -Rearrangements und denen am KDE des Ig κ -KDE-Rearrangements (asymptotischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, Signifikanzkorrektur nach Dunn-Bonferroni (p_{kor}): $z=-3,955$, $p=0,000077$, $p_{\text{kor}}=0,003$, $n=42$). Die Deletionen am V κ zu denen am J κ des Ig κ -J κ -Rearrangements (asymptotischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $z=-2,316$, $p=0,021$, $p_{\text{kor}}=0,084$, $n=42$) zeigten nach Signifikanzkorrektur keinen signifikanten Unterschied mehr. Die Deletionen am V κ bzw. Intron/RSS zu denen am KDE des Ig κ -KDE-Rearrangements (asymptotischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $z=-1,940$, $p=0,052$, $p_{\text{kor}}=0,208$, $n=43$) und am J κ des Ig κ -J κ -Rearrangements zum V κ bzw. Intron/RSS des Ig κ -KDE-Rearrangements (asymptotischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $z=-0,768$, $p=0,442$, $p_{\text{kor}}=1,0$, $n=42$) zeigten keinen signifikanten Unterschied.

3.4 RQ-PCR

Auf der Basis des Sequenzierungsergebnisses wurden für die RQ-PCR allelspezifische Primer erstellt und getestet. Die Untersuchungen wurden für Gruppen von Patienten in aufeinander folgenden Durchgängen durchgeführt. Bei den Ergebnissen von Ig κ -J κ hatte sich in den ersten Durchgängen eine große Anzahl von fehlenden Signalen in der Primertestung trotz guter Gensequenz gezeigt, sodass hier am ehesten von einem technischen Problem z.B. der Sonde auszugehen war. Daraufhin wurde in den späteren Durchgängen vorrangig Ig κ -KDE-Rearrangements untersucht. Für 15 Patienten mit Ig κ -J κ -Rearrangement wurden daher keine Primer designed.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Tests der Verdünnungsreihe aus den Untersuchungen dieser Arbeit.

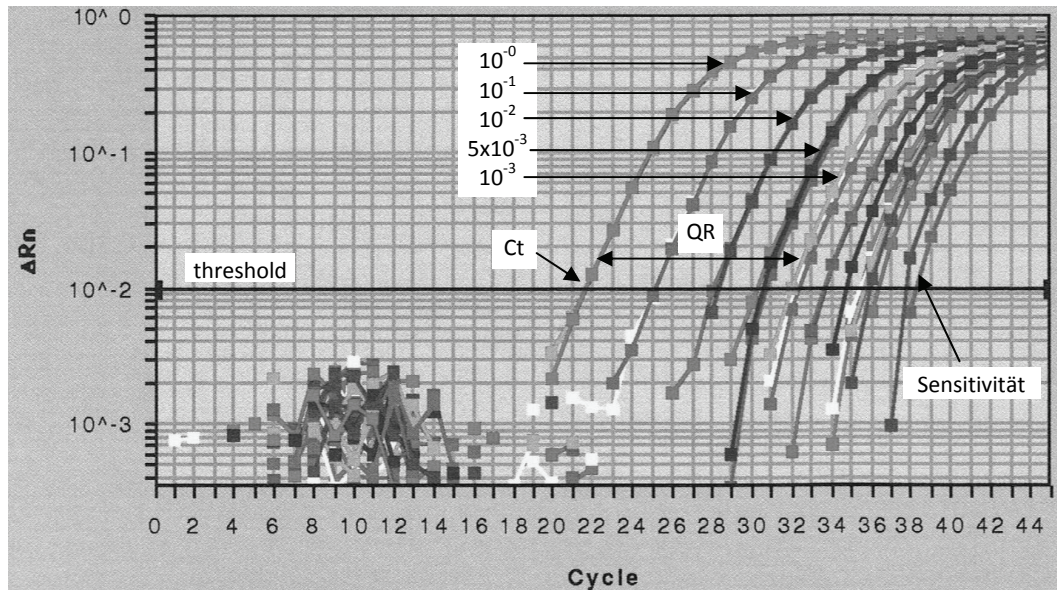


Abbildung 9: Beispiel einer Verdünnungsreihentestung mit RQ-PCR (Abszisse: Anzahl der PCR-Zyklen (Cycle), Ordinate: Logarithmus der Signalstärke des Fluoreszenzsignals (ΔRn), Ct - cycle threshold, QR - quantitative range).

Der threshold wurde so gewählt, dass er im gut messbaren exponentiellen Teil der Kurve des Fluoreszenzsignals mit ausreichendem Abstand vom Hintergrundrauschen und vom Plateau der Kurve liegt. Sensitivität bezeichnet das Amplifikat der niedrigsten Verdünnungsstufe, welches noch ein spezifisches Signal liefert und mindestens 1 Ct vom Signal des polyklonalen Hintergrundes entfernt ist. Die Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} und 5×10^{-3} wurden im Doppelansatz, 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} und 10^{-5} im Dreifachansatz getestet.

Aus den Ct der Verdünnungsreihe und der jeweiligen bekannten Kopienzahl wurde eine lineare Regressionsgerade (Standardkurve) errechnet, über die sich die diagnostischen Materialien quantifizieren ließen. Abbildung 10 zeigt die zugehörige Standardkurve zu dem Test aus Abbildung 9. Dargestellt sind die fünf Stufen der Verdünnungsreihe, die im quantitativen Messbereich liegen.

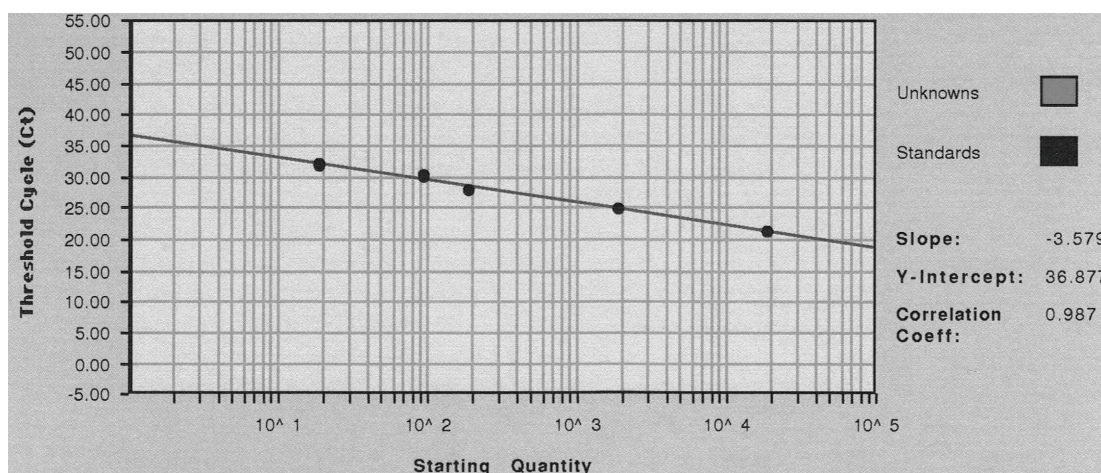


Abbildung 10: Standardkurve der fünf Stufen der Verdünnungsreihe innerhalb des quantitativen Messbereiches von 10^0 bis 10^{-3} . Abszisse: Cycle threshold (Ct), Ordinate: Kopienzahl (logarithmisch). Aufgetragen sind die Mittelwerte der Cts der zu den Verdünnungsstufen gehörigen Kopienzahlen. (slope - Steigung der Standardkurve, Y-Intercept - Schnittpunkt mit der Ordinate, Correlation Coeff - Korrelationskoeffizient).

Von den 38 Patienten mit Ig κ -J κ -Rearrangement wurden für 23 Patienten insgesamt 24 Primer generiert (Tabelle C im Anhang). Für die 33 Patienten mit Ig κ -KDE-Rearrangement wurden 43 Primer entworfen (Tabelle D im Anhang), da teilweise für beide Allele Primer generiert werden konnten. Da für einige Patienten sowohl Ig κ -J κ - als auch Ig κ -KDE-Primer vorlagen, standen insgesamt 67 allelspezifische Primer für 41 Patienten für den MRD-Nachweis zur Verfügung.

Aufgrund eingeschränkter Ergebnisse in der Primertestung konnte die Diagnostik nicht mit allen Primern bzw. für alle Patienten fortgeführt werden. In Abbildung 11 ist der entsprechende Ablauf dargestellt.

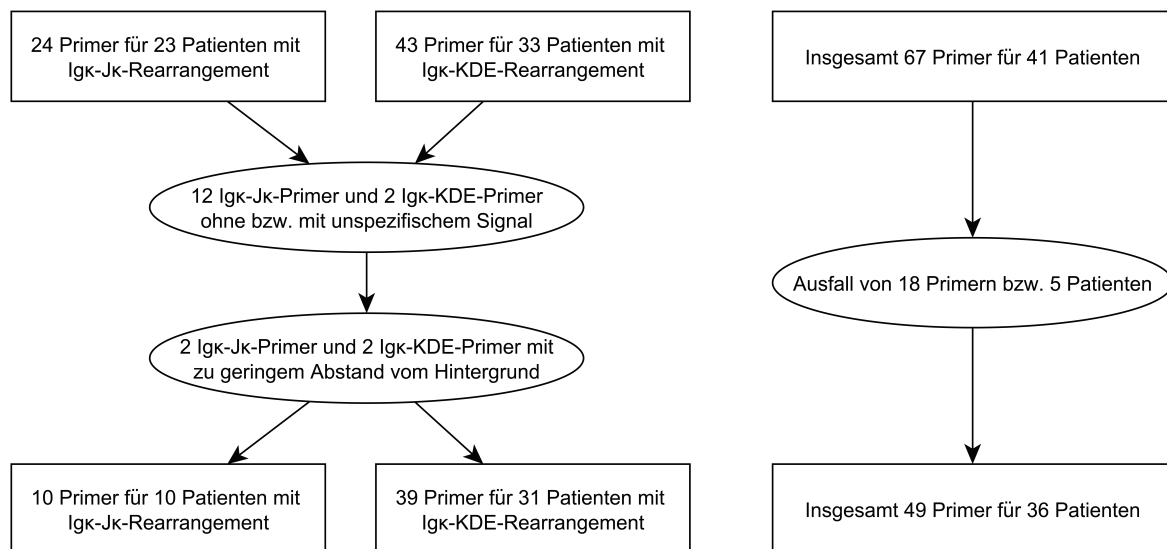


Abbildung 11: Flussdiagramm zur Visualisierung der Anzahl von Primern und Patienten insgesamt sowie jeweils für die beiden Marker Ig κ -J κ und Ig κ -KDE im Rahmen der Primertestung. Sequenzen der Ig κ -J κ -Primer in Tabelle C im Anhang, der Ig κ -KDE-Primer in Tabelle D im Anhang.

Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

Zwölf der 24 Ig κ -J κ -Primer und zwei der insgesamt 43 Ig κ -KDE-Primer lieferten im Primertest kein bzw. ein unspezifisches Signal und waren damit für eine weitere MRD-Analyse ungeeignet. Bei jeweils zwei Primern von Ig κ -J κ und Ig κ -KDE war der Abstand zum Fluoreszenzsignal des polyklonalen Hintergrundes zu gering, sodass eine Unterscheidung zwischen unspezifischer Amplifikation und spezifischem RQ-PCR Signal entsprechend der Qualitätskriterien nicht möglich war (van der Velden et al. 2007). Diese Rearrangements wurden nicht für die weitere Diagnostik verwendet.

Weil kein weiterer Primer vorlag, konnte für insgesamt fünf Patienten die Diagnostik nicht weitergeführt werden (zwei wegen fehlender bzw. unspezifischer Signale, drei wegen zu geringem Abstand zwischen Signal des Primärmaterials und dem des polyklonalen Hintergrundes).

Schließlich standen noch 49 Primer für 36 Patienten zur Durchführung der quantitativen PCR zur Verfügung. Zehn der Primer waren für Ig κ -J κ , davon fünf von Patienten mit Ig κ -J κ allein und fünf von Patienten mit Ig κ -J κ und Ig κ -KDE. 39 Primer waren für Ig κ -KDE, davon 33 von Patienten mit Ig κ -KDE allein und sechs von Patienten mit Ig κ -J κ und Ig κ -KDE (Tabelle 21).

Tabelle 21: Anzahl und Verteilung der Primer für die RQ-PCR

#inklusive eines Primers des zweiten Allels; *inklusive sieben Primern des zweiten Allels.

| Ig κ -J κ allein | Ig κ -J κ und Ig κ -KDE | Ig κ -KDE allein | Summe |
|--------------------------------|---|-------------------------|-----------|
| 5 Primer | 5 Ig κ -J κ -Primer 6 Ig κ -KDE-Primer [#] | 33 Primer [*] | 49 Primer |

Für fünf der insgesamt 36 Patienten konnten Primer sowohl für Ig κ -J κ - als auch Ig κ -KDE-Rearrangements generiert werden. Ebenfalls fünf der Patienten hatten einen Primer für Ig κ -J κ , 26 Patienten mindestens einen Primer für Ig κ -KDE (Abbildung 12). Bei acht der Patienten mit Ig κ -KDE-Rearrangement lagen Primer für beide Allele vor (sieben mit Ig κ -KDE allein, einer mit Ig κ -J κ und Ig κ -KDE). Die weiteren Untersuchungen wurden bei diesen Patienten mit dem Primer durchgeführt, der im Primertest die größere Spezifität aufwies, ausgedrückt im größeren ΔC_t zwischen Primärmaterial und dem unspezifischen Signal des polyklonalen Hintergrundes.

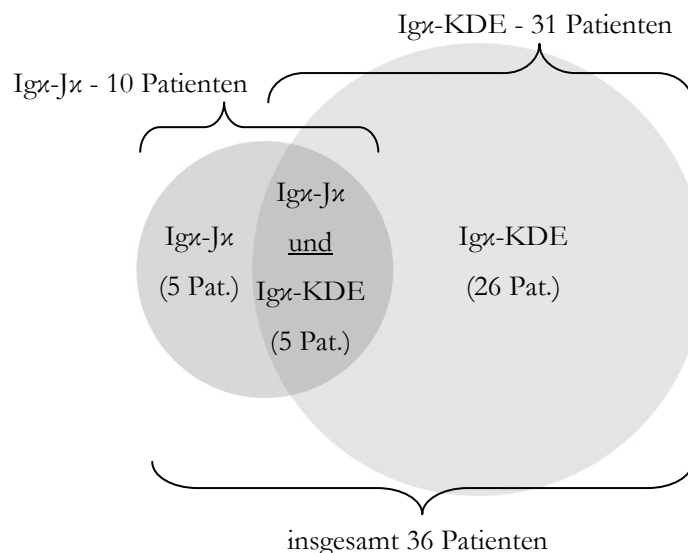


Abbildung 12: Anzahl und Verteilung der Patienten für die RQ-PCR.

Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

3.4.1 Sensitivität und Spezifität der allelspezifischen Ig κ RQ-PCR Assays

Die Sensitivität und Spezifität der ASO-PCR werden durch verschiedene Faktoren bestimmt. Unter anderem spielen die Länge und die Basenzusammensetzung der N-Region eine Rolle, sowie die unspezifische Amplifikation polyklonaler B-Zellen, welche die Sensitivität und Spezifität der MRD-Analyse einschränken. Die unspezifische Amplifikation manifestiert sich dabei in einem frühen cycle threshold (Ct) des polyklonalen Hintergrundes, wodurch das spezifische Signal in der Tumorprobe nicht mehr sicher abgegrenzt werden kann.

In 9 von 10 der Ig κ -J κ -Rearrangements zeigte sich ein unspezifisches Signal des polyklonalen Hintergrundes mit Ct-Werten zwischen 30,6 und 37. Bei den Ig κ -KDE-Rearrangements war in 27 von 31 Fällen (87%) ein unspezifisches Signal nachweisbar. Der Ct lag hier zwischen 29,1 und 40,7.

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der unspezifischen Amplifikation von Hintergrundsignalen der einzelnen MRD-Targets zusammengefasst. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Ig κ -Rearrangements lag der Anteil der unspezifischen Hintergrundamplifikationen bei den etablierten MRD-Markern IgH mit 52% bzw. t(11;14) mit 32% deutlich niedriger. Im Falle einer unspezifischen Amplifikation des Hintergrundes lagen die Ct-Werte dort bei 39 bzw. 40. Daraus folgend waren die Sensitivität und der quantitative Messbereich für Ig κ um eine Log₁₀-Stufe niedriger als bei IgH und t(11;14). Dies führte dazu, dass die Qualitätskriterien zur Auswertung der quantitativen PCR auf der Grundlage der Vorgaben von van der Velden et al. bei einer großen Anzahl der in dieser Arbeit mit Ig κ -Rekombinationen untersuchten Patienten nicht erfüllt werden konnten (van der Velden et al. 2007). Statistisch lassen sich eindeutige Unterschiede zwischen den vier Markern für die Amplifikation des polyklonalen Hintergrunds, die Sensitivität und den QR belegen. Beispielhaft sei hier die Untersuchung auf Unterschiede der Verteilung der Sensitivität zwischen den Markern erwähnt. Die Testung erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung nach Dunn-Bonferroni (p_{korr})). Nach Korrektur des Signifikanzniveaus waren die Unterschiede zwischen Ig κ -KDE und IgH ($p = 0,00024$, $p_{\text{korr}} = 0,0015$, $n = 25$), Ig κ -KDE und t(11;14) ($p = 0,00002$, $p_{\text{korr}} = 0,0002$, $n = 22$), Ig κ -J κ und IgH ($p = 0,008$, $p_{\text{korr}} = 0,048$, $n = 9$) sowie Ig κ -J κ und t(11;14) ($p = 0,008$, $p_{\text{korr}} = 0,048$, $n = 9$) signifikant. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Paarungen Ig κ -J κ und Ig κ -KDE ($p = 1,0$, $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 5$), sowie IgH und t(11;14) ($p = 0,026$, $p_{\text{korr}} = 0,156$, $n = 49$).

Tabelle 22: Vergleich von Amplifikation des polyklonalen Hintergrunds, Sensitivität und QR der einzelnen MRD-Targets (jeweils Mediane). Details siehe Abb. a-c im Anhang.

Ct - Cycle threshold, QR - quantitativer Messbereich.

| | Ig κ -J κ | Ig κ -KDE | IgH | t(11;14) |
|--|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Anteil mit Amplifikation des polyklonalen Hintergrunds | 90% | 87% | 52% | 32% |
| Ct bei Amplifikation des Hintergrunds [range] | 32,8 [30,6;37] | 34,4 [29,1;40,7] | 39,1 [35,1;43] | 39,7 [36,9;44,7] |
| Sensitivität | $5,3 \cdot 10^{-4}$ | $2,8 \cdot 10^{-4}$ | $1,0 \cdot 10^{-5}$ | $1,0 \cdot 10^{-5}$ |
| QR | $5,6 \cdot 10^{-3}$ | $1,9 \cdot 10^{-3}$ | $1,8 \cdot 10^{-4}$ | $7,0 \cdot 10^{-5}$ |

Die Ergebnisse bezüglich der Steigung der Standardkurve und des Korrelationskoeffizienten waren zwischen den einzelnen Markern vergleichbar. Die Mediane der Steigung betrugen -3,6 für Ig κ -J κ , -3,6 für Ig κ -KDE, -3,5 für IgH und -3,5 für t(11;14). Der Median des Korrelationskoeffizienten betrug für IgH, t(11;14) und Ig κ -KDE 0,99, für Ig κ -J κ 0,995. Sobald also die Voraussetzungen zur Erstellung einer Standardkurve erfüllt waren, waren deren Charakteristika zwischen den Markern vergleichbar. Für Details und die Ergebnisse der Signifikanztestung für die Amplifikation des polyklonalen Hintergrunds, des QR, der Steigung der Standardkurve sowie des Korrelationskoeffizienten siehe Abb. a-e im Anhang.

Da sich weder die Länge der N-Regionen (siehe Kapitel 3.3), noch die Ergebnisse für Sensitivität, QR oder Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (siehe Abb. a-c im Anhang) zwischen Ig α -J α und Ig α -KDE unterschieden, wurden die Längen der N-Regionen für die weitere statistische Analyse gepoolt.

Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Länge der N-Region und dem Auftreten einer Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (lineare Regression $F(1, 38) = 54,577$, $p < 0,000001$, $R^2 = 0,59$). Je kürzer die N-Region des jeweiligen Ig α -Rearrangements ausfiel, desto früher trat im Rahmen der RQ-PCR ein unspezifisches Signal mit einem niedrigen Ct in der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes auf. Da der Ct des Primärmaterials letztlich auch von der Wahl des thresholds abhängt, der in einem gewissen Rahmen frei gewählt werden kann, wurde zusätzlich der Zusammenhang zwischen Länge der N-Region und ΔCt zwischen Ct des Primärmaterials und Ct des polyklonalen Hintergrundes überprüft. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang ($F(1, 38) = 35,648$, $p = 0,000001$, $R^2 = 0,484$). Abbildung 13 zeigt die Korrelation der Länge der N-Region der Ig α -Rearrangements zur Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes sowie dem ΔCt zwischen Primärmaterial und der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes der allelspezifischen Ig α RQ-PCR Assays.

Abbildung 14 verdeutlicht den Zusammenhang der Länge der N-Region zu den Ergebnissen bezüglich Sensitivität und QR (jeweils logarithmisch transformiert) für die Ig α -Rearrangements insgesamt. Je länger die N-Region war, desto besser waren Sensitivität und QR. Abbildung 15 zeigt den Zusammenhang der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes zu den Ergebnissen von Sensitivität und QR (jeweils logarithmisch transformiert). Sowohl für die Sensitivität als auch für den QR lässt sich also ein Zusammenhang mit der Länge der N-Region bzw. dem Ct des polyklonalen Hintergrundes zeigen.

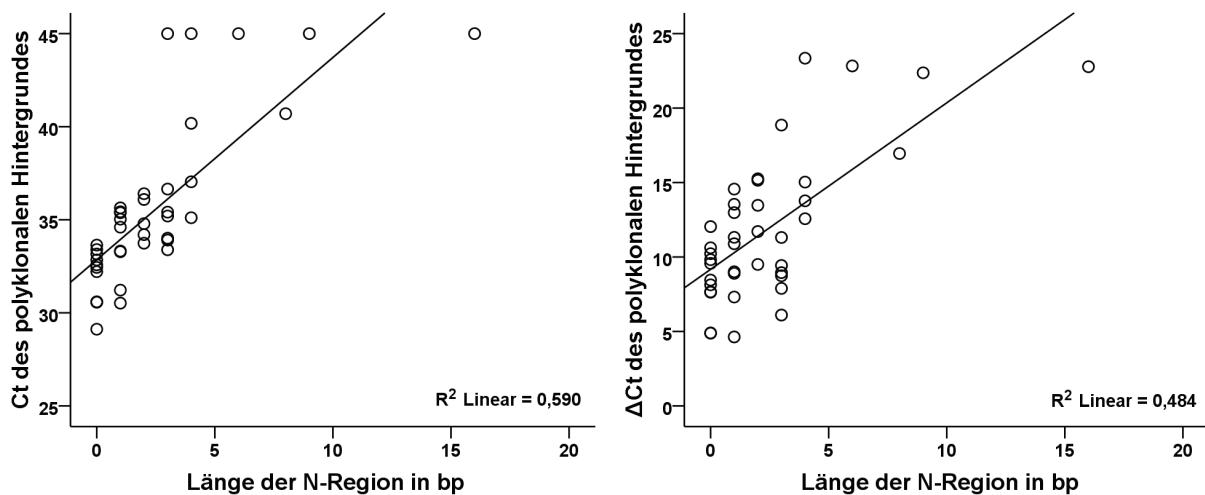


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen Länge der N-Region in Basenpaaren [bp] (Abszisse) und der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (links) sowie ΔCt des Primärmaterials zur Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (rechts) (jeweils Ordinate) mit linearer Regression. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang der Länge der N-Region sowohl mit dem Ct des polyklonalen Hintergrundes als auch mit dem ΔCt zwischen Ct des Primärmaterials und Ct des polyklonalen Hintergrundes.

Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes: $F(1, 38) = 54,577$, $p < 0,000001$, $R^2 = 0,59$; ΔCt der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes: $F(1, 38) = 35,648$, $p = 0,000001$, $R^2 = 0,484$.

Ct - Cycle threshold, ΔCt - Abstand der Ct-Werte vom Primärmaterial zum polyklonalem Hintergrund, R^2 Linear - Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

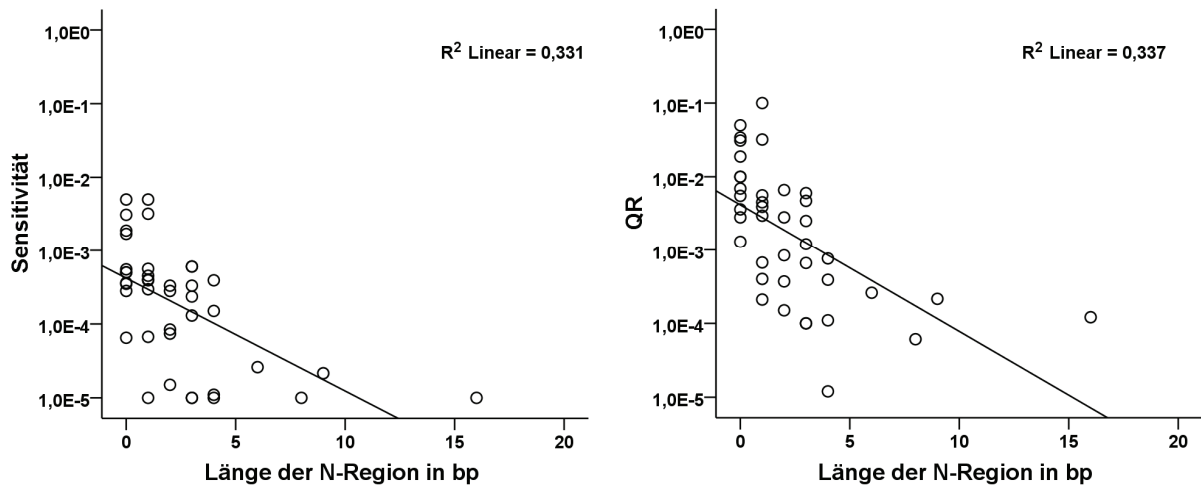


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Länge der N-Region in Basenpaaren [bp] (Abszisse) und Ergebnis von Sensitivität (links) sowie QR (rechts) für Immunglobulinleichte kette kappa gesamt (jeweils Ordinate, logarithmische Darstellung) mit linearer Regression. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Länge der N-Region und den Ergebnissen für Sensitivität und QR.

Sensitivität: $F(1, 38) = 18,797$, $p = 0,0001$, $R^2 = 0,331$; QR: $F(1, 38) = 19,316$, $p = 0,00009$, $R^2 = 0,337$.

QR - quantitativer Messbereich, R^2 Linear - Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

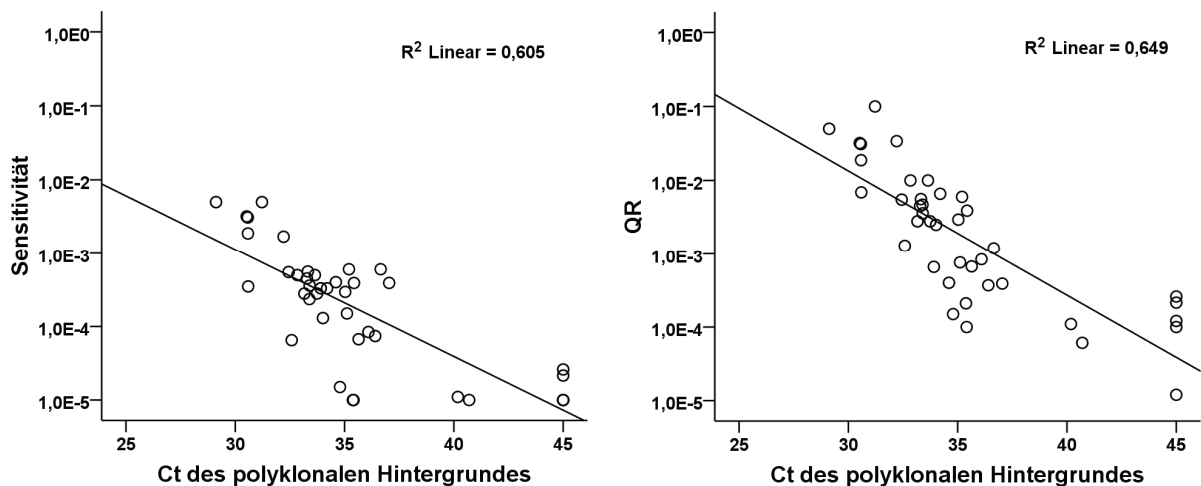


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Ct des polyklonalen Hintergrundes (Abszisse) und Ergebnis von Sensitivität (links) sowie QR (rechts) für Immunglobulinleichte kette kappa gesamt (jeweils Ordinate, logarithmische Darstellung) mit linearer Regression. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Ct des polyklonalen Hintergrundes und den Ergebnissen für Sensitivität und QR.

Sensitivität: $F(1, 38) = 58,069$, $p < 0,000001$, $R^2 = 0,605$; QR: $F(1, 38) = 70,377$, $p < 0,000001$, $R^2 = 0,649$.

QR - quantitativer Messbereich, Ct - Cycle threshold, R^2 Linear - Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

Entsprechend der linearen Regression wurde eine Sensitivität von 10^{-4} in dieser Arbeit ab einer Länge der N-Region von 4,1 bp bzw. einem Ct des polyklonalen Hintergrundes von 37,2 erreicht, eine Sensitivität von 10^{-5} ab 10,6 bp bzw. einem Ct von 44.

Es erfolgte eine statistische Analyse auf Unterschiede in der Verteilung der Ct-Werte der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes, der Sensitivität und des QR in Abhängigkeit von der Länge der N-Regionen mit Kruskal-Wallis-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Länge der N-Region wurde dabei in die Kategorien „0 bp“, „1 bp“, „2 bp“, „3 bp“ und „ ≥ 4 bp“ unterteilt. In der Testung bestätigte sich, dass sich alle drei Größen je nach Länge der N-Region unterschieden (Sensitivität: $\chi^2(4) = 14,606$, $p = 0,006$, $n = 40$; QR: $\chi^2(4) = 20,262$, $p = 0,00044$, $n = 40$; Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes: $\chi^2(4) = 26,341$, $p = 0,000027$, $n = 40$). In der anschließenden paarweisen Post-hoc-Testung (zweiseitiger Mann Whitney-U-Test zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ mit Signifikanzkorrektur nach Dunn-Bonferroni (p_{korrr})) zeigte sich, dass sich bei der Sensitivität die Längen der N-Region "0 bp" und " ≥ 4 bp" ($z = 3,467$, $p_{\text{korrr}} = 0,005$) und beim QR die Längen der N-Region "0 bp" und " ≥ 4 bp" ($z = 4,279$, $p_{\text{korrr}} = 0,0016$) sowie "1 bp" und " ≥ 4 bp" ($z = 2,883$, $p_{\text{korrr}} = 0,039$) signifikant unterschieden. Bei der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes unterschieden sich die Längen der N-Region "0 bp" und "3 bp" ($z = -2,993$, $p_{\text{korrr}} = 0,028$), "0 bp" und " ≥ 4 bp" ($z = -4,912$, $p_{\text{korrr}} = 0,0006$) sowie "1 bp" und " ≥ 4 bp" ($z = -2,991$, $p_{\text{korrr}} = 0,028$) signifikant. Die Effektstärke nach Cohen lag in allen Fällen bei $r > 0,5$, sodass von einem starken Effekt auszugehen ist (Cohen 1992). Die restlichen paarweisen Vergleiche zeigten keine Signifikanz. Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle G zu finden. Ergänzend hierzu sind im Anhang in den Tabellen E und F für die mit Ig κ -J κ - bzw. mit Ig κ -KDE-Primern getesteten Patienten jeweils die Sensitivität und Spezifität der allelspezifischen Ig κ -RQ-PCR Assays den Charakteristika der entsprechenden N-Region gegenübergestellt.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein deutlicher Einfluss der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes und der Länge der N-Region auf die Ergebnisse von Sensitivität und QR gezeigt werden. Die Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes hing dabei vor allem von der Länge der N-Region ab. Insofern darf die Länge der N-Region als der bedeutenste Einflussfaktor für alle drei Größen gelten.

Nach Anwendung der unter 2.7.3 dargestellten Qualitätskriterien für die technischen Voraussetzungen der Auswertung der MRD-Diagnostik konnten insgesamt neun der 36 Patienten, bei denen eine RQ-PCR durchgeführt wurde, aufgrund der Steigung der Standardkurven der Verdünnungsreihen nicht ausgewertet werden (drei mit Ig κ -J κ -, sechs mit Ig κ -KDE-Rearrangement). Bei zwei weiteren Patienten umfasste die Standardkurve keine zwei Log₁₀-Stufen (beide mit Ig κ -KDE-Rearrangement), weshalb keine Auswertung möglich war.

Die gewünschte Sensitivität von mindestens 10^{-4} erreichten zehn der verbliebenen 25 patientenspezifischen Assays (einer mit Ig κ -J κ -, acht mit Ig κ -KDE-Rearrangement und einer mit beiden Rearrangements). Eine Sensitivität von mindestens 5×10^{-4} erreichten 21 von 25 Assays (einer mit Ig κ -J κ -, 15 mit Ig κ -KDE-Rearrangement und fünf mit beiden Rearrangements). Einen QR von mindestens 10^{-4} erreichten drei von 25 Assays (zwei mit Ig κ -KDE-Rearrangement und einer mit beiden Rearrangements). Einen QR von mindestens 5×10^{-4} erreichten neun (einer mit Ig κ -J κ -, sechs mit Ig κ -KDE-Rearrangement und zwei mit beiden Rearrangements), einen QR von mindestens 10^{-3} zwölf von 25 Assays (einer mit Ig κ -J κ -, neun mit Ig κ -KDE-Rearrangement und zwei mit beiden Rearrangements).

Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten der in dieser Arbeit untersuchten Patienten auch für IgH und t(11;14) in Tabelle 23 aufgeführt. Es zeigt sich, dass Ig κ sowohl in Bezug auf Sensitivität als auch QR schlechtere Ergebnisse erbringt als IgH und t(11;14). Die in dieser Arbeit gewünschte Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ erreichten nur 40% der Ig κ -Assays. Bei IgH und t(11;14) betrug dieser Anteil jeweils 98%. Vergleichbar dazu waren auch die Ergebnisse für den QR, wo Ig κ in 36% der Fälle $\leq 5 \times 10^{-4}$ erreichte, IgH und t(11;14) dagegen in 88% bzw. 95% der Fälle. Auch der Anteil der aufgrund der Euro-MRD Kriterien nicht auswertbaren Patienten lag bei Ig κ deutlich höher (31% für Ig κ gegenüber 6% für IgH bzw. 8% für t(11;14)).

Zeigt Tabelle 23 die kumulative Verteilung der Ergebnisse für Sensitivität und QR, so schlüsseln die Abbildungen 16a und 16b die relative Verteilung in den einzelnen Kategorien auf.

Tabelle 23: Kategorisierte, kumulative Verteilung der Ergebnisse für Sensitivität und QR der drei Marker. Ausfall: * 9 wegen Steigung, 2 aufgrund zu weniger Verdünnungsstufen; ° 2 wegen Steigung, 1 aufgrund zu weniger Verdünnungsstufen, 1 wegen Regressionskoeffizient; # 5 wegen Steigung.

| Patientenspez. Assays = Patientenanzahl | Ausfall durch Euro-MRD Kriterien | Sensitivität $\leq 10^{-4}$ | Sensitivität $\leq 5 \times 10^{-4}$ | QR $\leq 10^{-4}$ | QR $\leq 5 \times 10^{-4}$ | QR $\leq 10^{-3}$ |
|---|--|--------------------------------|---|--------------------|----------------------------|---------------------|
| 36 Ig κ | 11* (verbleiben 25) | 10 von 25 (40%) | 21 von 25 (84%) | 3 von 25 (12%) | 9 von 25 (36%) | 12 von 25 (48%) |
| 63 IgH | 4° (verbleiben 59) | 58 von 59 (98%) | 59 von 59 (100%) | 23 von 59 (39%) | 52 von 59 (88%) | 59 von 59 (100%) |
| 60 t(11;14) | 5# (verbleiben 55) | 54 von 55 (98%) | 55 von 55 (100%) | 39 von 55 (71%) | 52 von 55 (95%) | 55 von 55 (100%) |

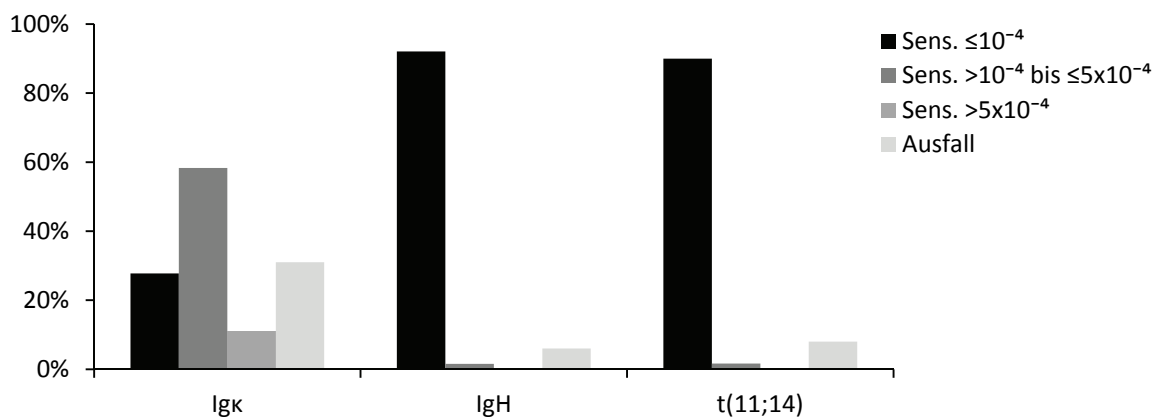


Abbildung 16a: Verteilung der Ergebnisse für Sensitivität (Sens.) bei den einzelnen Markern. IgH und t(11;14) erreichen in etwa 90% der Fälle eine Sensitivität $\leq 10^{-4}$. Im Gegensatz dazu erreicht Ig κ dies nur in knapp 30%.

Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ausfall - Anteil der nach Anwendung der Euro-MRD-Kriterien nicht auswertbaren Patienten.

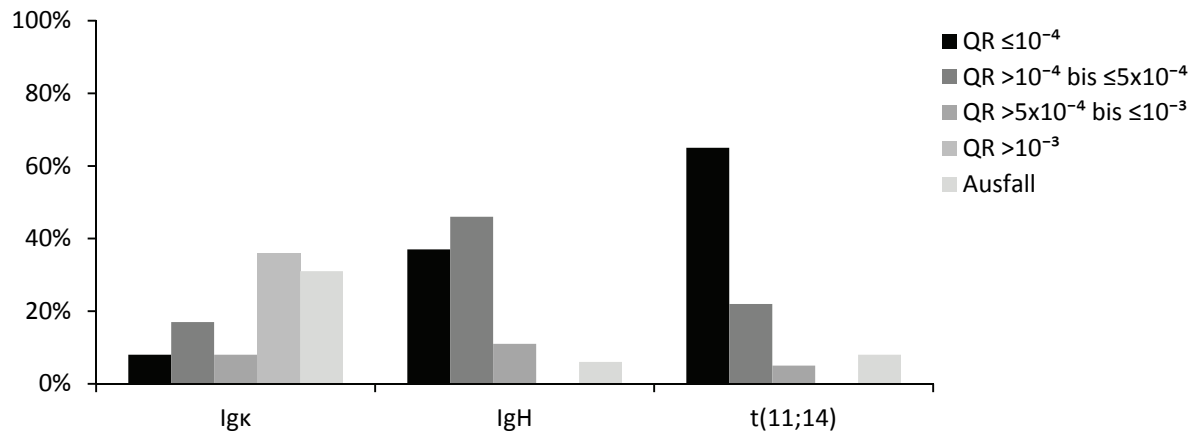


Abbildung 16b: Verteilung der Ergebnisse für den quantitativen Messbereich bei den einzelnen Markern. Der Anteil der fehlenden Ergebnisse ist der gleiche wie in Abb. 16a („Ausfall“). IgH und t(11;14) erreichen in ca. 85% einen QR von $\leq 5 \times 10^{-4}$. Mit Igk gelingt das nur in ca. 25% der Fälle.

Igk - Immunglobulinleichtkette kappa, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ausfall - Anteil der nach Anwendung der Euro-MRD-Kriterien nicht auswertbaren Patienten.

Nach Anwendung der o.g. Qualitätskriterien wurde die quantitative PCR mit Quantifizierung der Verlaufsmaterialien für die Patienten durchgeführt, die entweder eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} oder einen QR von mindestens 5×10^{-4} in ihren Assays aufwiesen. Dies traf auf elf Patienten zu (zehn mit guter Sensitivität, einer mit ausreichendem QR, davon ein Patient mit Igk-Jk-, acht Patienten mit Igk-KDE-Rearrangement und zwei Patienten mit beiden Rearrangements). Eine quantitative PCR von Verlaufsmaterialien unter Zuhilfenahme klonaler Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa konnte somit bei insgesamt elf von ursprünglich 85 Patienten (12,9%) bzw. von 41 Patienten (26,8%), für die Primer designed wurden, durchgeführt werden. Die Gensequenzen der elf Patienten, deren Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung den Qualitätskriterien entsprachen, wiesen im Mittel eine Länge der N-Region von 5 bp (Median 4 bp) auf.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Ergebnis der Anzahl der Patienten bezogen auf die Untersuchungsschritte dieser Arbeit (Tabelle 24):

Tabelle 24: Anzahl der Patienten in den einzelnen Arbeitsschritten dieser Arbeit.

* Bei einer in dieser Arbeit geforderten Sensitivität von min. 10^{-4} oder einem QR von min. 5×10^{-4} .

| Gesamtzahl der Patienten | Positives Ergebnis in Klonalitätsanalyse | Informative Gensequenz | Primerdesign | RQ-PCR durchgeführt | Erfüllen der Euro-MRD Kriterien | MRD-Diagnostik erfolgreich durchführbar* |
|---|--|------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------|--|
| 85 | 62 | 56 | 41 | 36 | 25 | 11 |
| 100% | 72,9% | 65,9% | 48,2% | 42,4% | 29,4% | 12,9% |
| Anteil von Patienten mit Primerdesign (n=41): | | | | | | |
| | | | 100% | 87,7% | 61% | 26,8% |

3.4.2 Quantifizierung von Verlaufsmaterialien mit RQ-PCR

Die Quantifizierung der MRD erfolgte bei den Patienten, deren Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung den unter 2.7.3 genannten Qualitätskriterien entsprachen und die mindestens eine Sensitivität von 10^{-4} oder einen QR von 5×10^{-4} erreicht hatten. Ein Patient erfüllte alle Voraussetzungen für die MRD-Diagnostik, allerdings lagen keine Verlaufsmaterialien zur Untersuchung vor. Im Folgenden werden exemplarisch die MRD-Verläufe dreier dieser Patienten dargestellt (Abbildungen 17 bis 19). Im Vergleich dazu wird als viertes Beispiel der MRD-Verlauf eines Patienten dargestellt, dessen Assay zwar die Euro-MRD Kriterien, nicht aber die in dieser Arbeit festgelegten Anforderungen an Sensitivität und QR erfüllte (Abbildung 20).

Auf der Ordinate ist jeweils das MRD-Niveau logarithmisch in wissenschaftlicher Notation aufgetragen, auf der Abszisse der Zeitpunkt der Probenentnahme in Relation zum Primärstaging. Proben, die MRD-positiv sind, werden mit ihrem MRD-Niveau angegeben. Proben, die positiv unterhalb des quantitativen Bereiches sind, werden mit einem MRD-Niveau von 10^{-6} und Proben, die MRD-negativ sind mit einem MRD-Niveau von 10^{-8} angegeben.

Der MRD-Verlauf von Patient MCL23 lässt sich mit allen vier Markern darstellen (Abbildung 17). Bei einer Sensitivität von $1,0 \times 10^{-5}$ für alle vier Marker sowie einem QR von $6,1 \times 10^{-5}$ für t(11;14) und Ig κ -KDE bzw. $1,2 \times 10^{-4}$ für IgH und Ig κ -J κ werden sowohl initialer Abfall als auch Rezidiv mit allen Markern erkannt. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

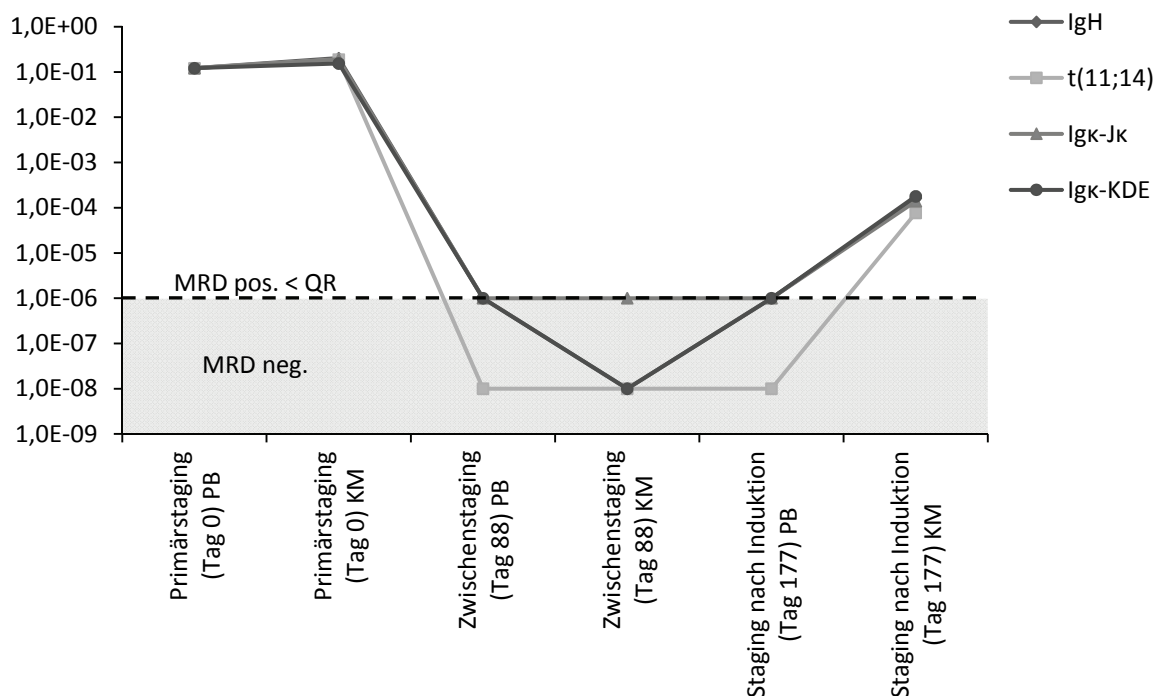


Abbildung 17: MRD-Verlauf von Patient MCL23 über sechs Monate mit in diesem Fall vier verschiedenen MRD-Markern mit guter Übereinstimmung. IgH verläuft ab Tag 88 wie Ig κ -KDE. Ordinate: MRD-Niveau (logarithmisch) in wissenschaftlicher Notation, Abszisse: Patientenproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zu späteren Zeitpunkten in Relation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Proben $< QR$ aber $> \text{Sensitivität}$ werden als „MRD pos. $< QR$ “ mit einem MRD-Niveau von 10^{-6} dargestellt. Proben unterhalb der Sensitivität („MRD neg.“) werden mit einem MRD-Niveau von 10^{-8} dargestellt.

PB - peripheres Blut, KM - Knochenmarkaspirat, MRD - minimal residual disease = Minimale Resterkrankung, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

Der MRD-Verlauf von Patient MCL12 lässt sich mit IgH, t(11;14) und Ig κ -KDE darstellen (Abbildung 18). Bei einer Sensitivität von $5,5 \times 10^{-5}$ für IgH bzw. $1,1 \times 10^{-5}$ für t(11;14) und Ig κ -KDE sowie einem QR von $5,5 \times 10^{-4}$ für IgH bzw. $1,1 \times 10^{-4}$ für t(11;14) und Ig κ -KDE lassen sich der initiale Abfall und der Gesamtverlauf nachvollziehen. Es zeigt sich eine hohe Übereinstimmung der MRD-Werte.

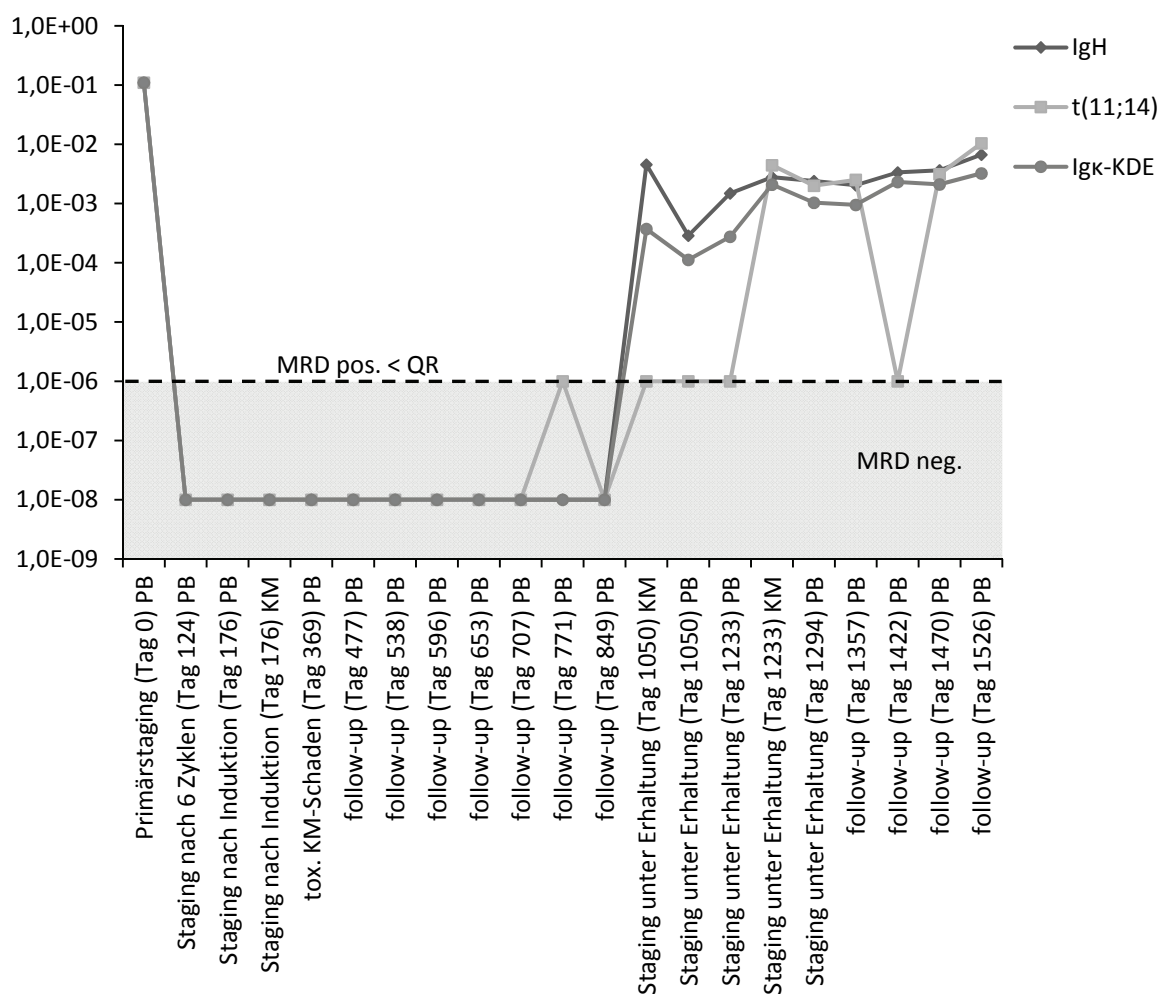


Abbildung 18: MRD-Verlauf von Patient MCL12 über 50 Monate mit in diesem Fall drei verschiedenen MRD-Markern, die eine große Übereinstimmung zeigen.

Ordinate: MRD-Niveau (logarithmisch) in wissenschaftlicher Notation, Abszisse: Patientenproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zu späteren Zeitpunkten in Relation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Proben $< QR$ aber $> \text{Sensitivität}$ werden als „MRD pos. $< QR$ “ mit einem MRD-Niveau von 10^{-6} dargestellt. Proben unterhalb der Sensitivität („MRD neg.“) werden mit einem MRD-Niveau von 10^{-8} dargestellt.

PB - peripheres Blut, KM - Knochenmarkaspirat, MRD - minimal residual disease = Minimale Resterkrankung, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

Der MRD-Verlauf von Patient MCL37 lässt sich mit drei Markern nachvollziehen (Abbildung 19). Bei einer Sensitivität von $1,0 \times 10^{-5}$ für IgH, t(11;14) und Ig κ -KDE sowie einem QR von $2,5 \times 10^{-5}$ für t(11;14) und Ig κ -KDE bzw. $1,2 \times 10^{-4}$ für IgH verlaufen die Kurven nahezu parallel, allerdings kann t(11;14) eine Probe (Tag 88 PB) mehr quantifizieren, als es IgH und Ig κ -KDE gelingt. Insgesamt zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

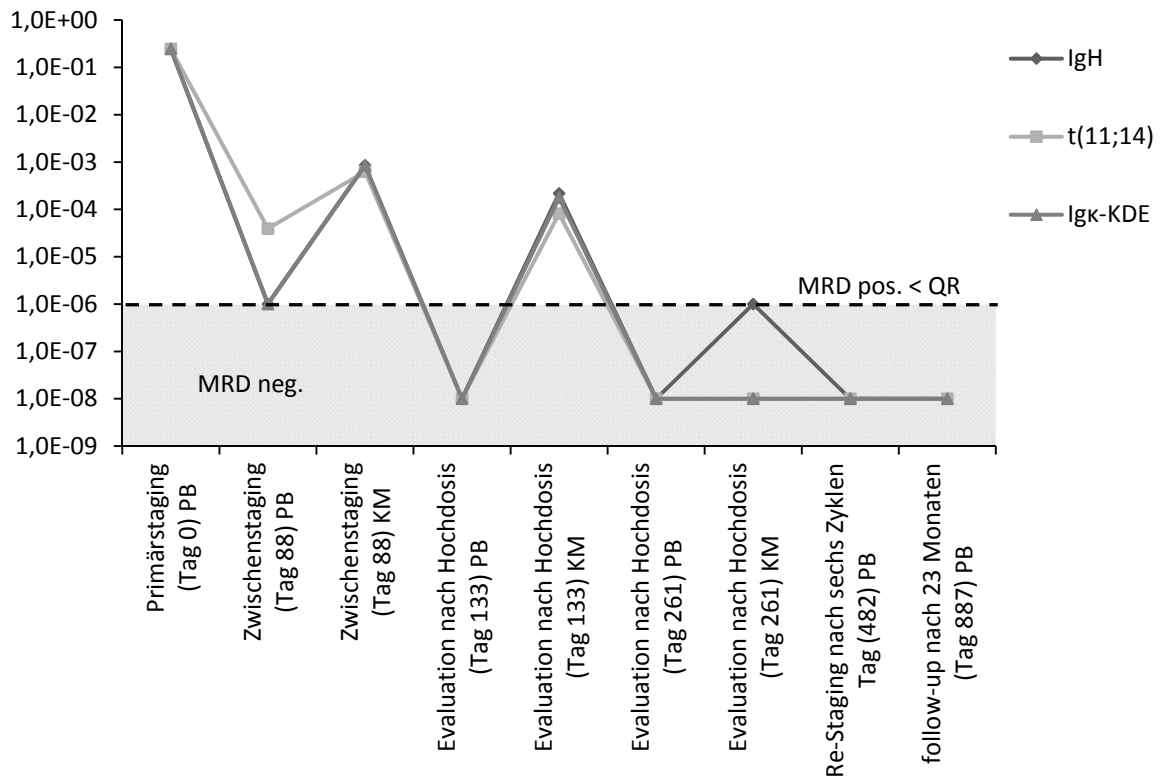


Abbildung 19: MRD-Verlauf Patient MCL37 über 23 Monate mit in diesem Fall drei verschiedenen MRD-Markern mit guter Übereinstimmung.

Ordinate: MRD-Niveau (logarithmisch) in wissenschaftlicher Notation, Abszisse: Patientenproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zu späteren Zeitpunkten in Relation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Proben $< QR$ aber $> \text{Sensitivität}$ werden als „MRD pos. $< QR$ “ mit einem MRD-Niveau von 10^{-6} dargestellt. Proben unterhalb der Sensitivität („MRD neg.“) werden mit einem MRD-Niveau von 10^{-8} dargestellt.

PB - peripheres Blut, KM - Knochenmarkaspirat, MRD - minimal residual disease = Minimale Resterkrankung, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

Der MRD-Verlauf von Patient MCL10 lässt sich mit IgH sowie Ig κ -J κ und Ig κ -KDE darstellen (Abbildung 20). Die Sensitivität für IgH beträgt $1,0 \times 10^{-5}$, die von Ig κ -J κ und Ig κ -KDE $5,6 \times 10^{-4}$ bzw. $2,8 \times 10^{-4}$. Beim QR ist der Unterschied mit $2,8 \times 10^{-5}$ für IgH gegenüber $5,6 \times 10^{-3}$ für Ig κ -J κ bzw. $2,8 \times 10^{-3}$ für Ig κ -KDE noch stärker ausgeprägt. Entsprechend erbringen die Marker in der MRD-Diagnostik auch unterschiedliche Ergebnisse. Beide Immunglobulin-kappa-Marker zeigen zu den vergleichenden Zeitpunkten ab Tag 106 aufgrund der geringeren Sensitivität eine MRD-Negativität an, wohingegen der IgH-Marker alle Verlaufsproben als MRD-positiv identifiziert. Erst bei einem hohen MRD-Niveau im Rezidiv zeigen die Ig κ -Marker MRD-Positivität dann auf dem gleichen Niveau an.

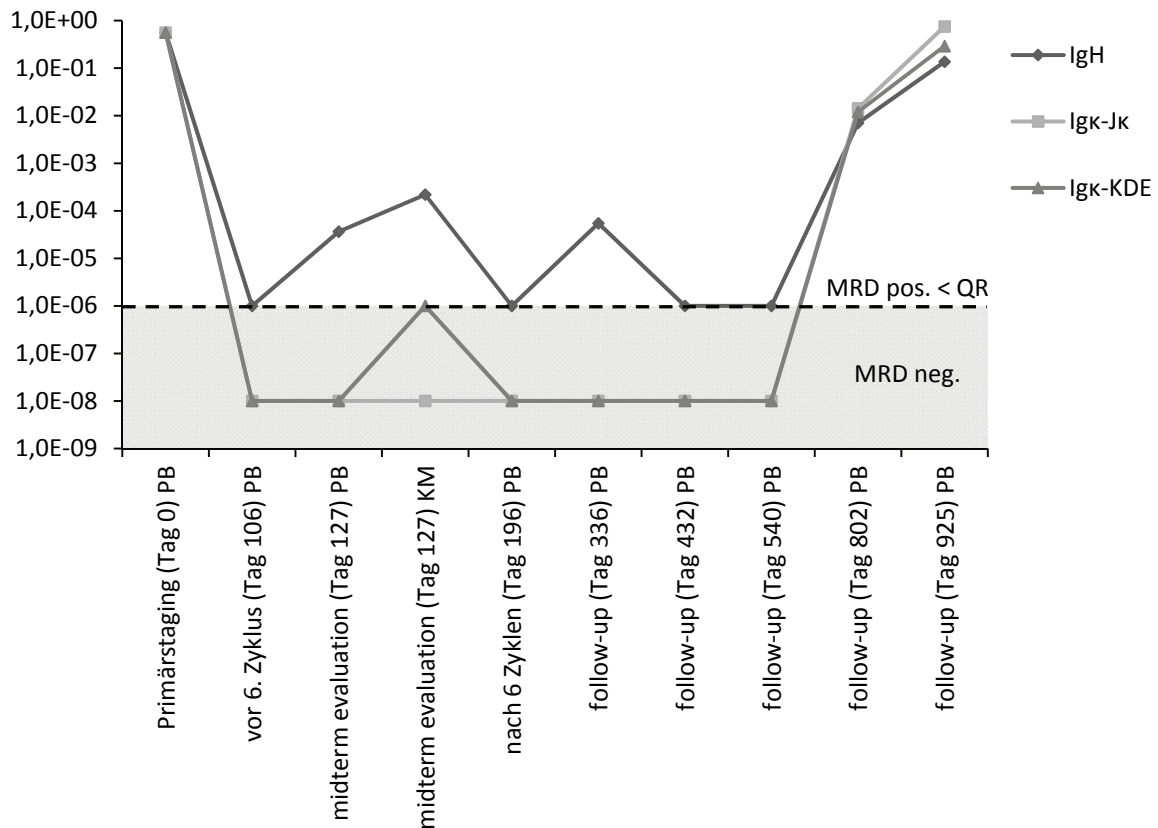


Abbildung 20: MRD-Verlauf von Patient MCL10 über 30 Monate mit in diesem Fall drei verschiedenen MRD-Markern.

Ordinate: MRD-Niveau (logarithmisch) in wissenschaftlicher Notation, Abszisse: Patientenproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zu späteren Zeitpunkten in Relation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

Proben < QR aber > Sensitivität werden als „MRD pos. < QR“ mit einem MRD-Niveau von 10^{-6} dargestellt. Proben unterhalb der Sensitivität („MRD neg.“) werden mit einem MRD-Niveau von 10^{-8} dargestellt.

PB - peripheres Blut, KM - Knochenmarkaspirat, MRD - minimal residual disease = Minimale Resterkrankung, IgH - Immunglobulinschwerkette, Igκ - Immunglobulinleichtkette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die MRD-Bestimmung mit Igκ in der Lage ist, gleichwertige Ergebnisse wie die etablierten Marker zu erbringen. Im Falle von eingeschränkter Sensitivität und QR des patientenspezifischen Assays können die Ergebnisse jedoch schlechter ausfallen. Dies kann in einer unzureichenden MRD-Diagnostik münden, sodass zum Beispiel eine Rezidivsituation nicht oder zu spät diagnostiziert wird.

4. Diskussion

4.1 Prämisse und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Erfassung residueller Erkrankung hat sich neben dem prätherapeutischen MIPI (MCL International Prognostic Index) in den letzten Jahren als wesentlicher prognostischer Faktor für Patienten mit MCL etabliert (Pott et al. 2010; Pott 2011; Liu et al. 2012; Callanan et al. 2015). Durch die Verbesserung der Therapie für Patienten mit MCL und die Einführung zahlreicher neuer Medikamente in der Tumorthherapie ergibt sich darüber hinaus die Notwendigkeit einer sensitiveren Erfassung des klinischen Ansprechens auf neue Therapien. Zur Prognoseerfassung und sensitiven Erfassung des Ansprechens auf molekularer Ebene eignet sich die quantitative RQ-PCR ganz besonders und erreicht über die Anwendung allelspezifischer Primer- und Sondensysteme eine hohe Sensitivität von bis zu 10^{-5} (Brüggemann et al. 2000). Allerdings ist die Erfassung der Minimalen Resterkrankung bislang auf die Patienten beschränkt, die ein PCR-detektierbares klonales Immunglobulinschwerkettengenrearrangement (IgH) bzw. eine Translokation t(11;14) aufweisen. Bei bis zu 10% der Patienten ist mit den beiden genannten molekularen Markern keine MRD-Diagnostik möglich. Die Gründe dafür können u.a. Mutationen im IgH-Genlocus oder das Fehlen einer mit PCR detektierbaren Translokation t(11;14) sein.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Eignung von klonalen Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa als Zielgen für die Untersuchung der MRD beim MCL zu evaluieren. Über die Definition eines neuen Zielgens sollte eine höhere Anzahl an Patienten hinsichtlich MRD erfasst werden können.

4.2 Klonalitätsanalyse

In dieser Arbeit wurde eine Klonalitätsanalyse an primärdiagnostischen Materialien von 85 Patienten durchgeführt. Die Verlaufsmaterialien der Patienten wurden mit einem ausreichend sensitiven Ig κ -MRD-Marker untersucht. Dazu standen Proben der Studien des Europäischen Mantelzell-Lymphom Netzwerks zur Behandlung von Patienten mit MCL zur Verfügung.

Die Untersuchung auf Klonalität erbrachte mit der verwendeten Konsensus-PCR für Ig κ -J κ bei 57,6% der Patienten ein positives Signal, die Konsensus-PCR für Ig κ -KDE bei 48,2% der Patienten. Diese Ergebnisse decken sich zum Teil mit den in der Literatur zu findenden Daten für verschiedene B-Zell-Neoplasien. Bei CLL-Patienten konnte in 56% und bei Patienten mit Präkursor-B-ALL in 44% der Fälle ein klonales KDE-Rearrangement nachgewiesen werden (Stolz et al. 1999). Für das Multiple Myelom liegen Daten vor, die klonale Signale bei der Untersuchung auf Rekombinationen mit KDE-Beteiligung in 45% der Fälle fanden, wovon wiederum 88% erfolgreich sequenziert werden konnten (Puig et al. 2012). Beim MCL wurden in 94% ein klonales Ig κ -J κ - und in 75% ein klonales Ig κ -KDE-Rearrangement gefunden (Evans et al. 2007).

Beide Marker (Ig κ -J κ sowie Ig κ -KDE) zusammen genommen lieferte die Klonalitätsuntersuchung der Immunglobulinleichtkette kappa in dieser Arbeit in 72,9% der Fälle mindestens ein klonales Signal (62

von 85 Patienten). Das ist ein höherer Anteil als die 58,3% mit einem klonalen Ig κ -Rearrangement, die bei verschiedenen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden konnten (Krsková et al. 2004). Dies ist auf die Verwendung von optimierten Primersystemen des BIOMED II Protokolls für die Klonalitätsanalyse in dieser Arbeit zurückzuführen. Mit den BIOMED II Primern konnte in der Untersuchung von Evans et al. in einer Kohorte diagnostischer Lymphknoten von Patienten mit MCL eine Detektionsrate klonaler Ig κ -Rearrangements von 100% erreicht werden (Evans et al. 2007). Die im Vergleich dazu etwas geringere Detektionsrate in dieser Arbeit ist möglicherweise auf die Analyse an diagnostischen Blut und Knochenmarkproben zurückzuführen, die im Allgemeinen eine deutlich geringere Infiltrationsrate aufweisen als diagnostisches Lymphknotengewebe. In der genannten Untersuchung von Evans et al. wiesen alle untersuchten MCL-Fälle mindestens zwei klonale Signale in den IgH-Konsensus-PCRs (FR1-3) auf. 27% der Fälle zeigten zwei, 73% mehr als zwei klonale Signale in der Ig κ -Konsensus-PCR. IgH und Ig κ zusammengenommen wiesen alle Fälle mindestens drei klonale Signale auf (Evans et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte für gut die Hälfte der Patienten mehr als ein klonales Signal in der Ig κ -Konsensus-PCR detektiert werden. Bezogen auf die 62 Patienten, die mindestens ein klonales Signal lieferten, zeigten 47% ein klonales Signal, 40% zwei und 13% mehr als zwei klonale Signale.

4.3 Gensequenzanalyse

Die Analyse der identifizierten Ig κ -Sequenzen hinsichtlich der an der Rekombination beteiligten Gene zeigte eine präferentielle Verwendung bestimmter Genfamilien, die sich mit der in der Literatur berichteten deckt (Beishuizen et al. 1997; Stolz et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Verteilung der J κ -Familien eine überwiegende Verwendung (in absteigender Häufigkeit) von J κ 2, J κ 4, und J κ 1 bzw. J κ 5, die gleich häufig verwendet wurden. J κ 2 wurde bevorzugt verwendet, die Verwendung von J κ 3 wurde nur in einem Fall beobachtet. Auch wenn die Datenlage zur Verteilung der J κ -Familien insgesamt gering ist, deckt sich dieses Ergebnis auch mit der beschriebenen vornehmlichen Nutzung von J κ 1, J κ 2 und J κ 4 im Rahmen der V κ -J κ -Rekombination in B-Zell-Lymphomen (van der Burg et al. 2001). Auch in einer Untersuchung von gesunden IgM⁺-B-Zellen zeigte sich eine präferentielle Verwendung von J κ 1 und J κ 2, gefolgt von J κ 4 und J κ 5 und nur geringer Nutzung von J κ 3 (Foster et al. 1997), so dass hier nicht von einer tumorspezifischen Selektion bestimmter Rearrangements ausgegangen werden kann.

Dies trifft ebenfalls für die Nutzung der verschiedenen V κ -Genfamilien im Rahmen der V κ -J κ - und V κ -KDE-Rekombination zu. Passend zu den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten sind auch in der hier untersuchten Kohorte der MCL am häufigsten Gene der V κ 1-Familie gefolgt von denen von V κ 2-4 involviert. Diese Beobachtung wird darauf zurückgeführt, dass die Genfamilien entsprechend der Anzahl ihrer verfügbaren Gensegmente genutzt werden, wobei zum Beispiel V κ 1 die größte Anzahl an Gensegmenten enthält (van Dongen et al. 2003).

Die Mutationsfrequenz der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Ig κ -Gensequenzen war im Gegensatz zu den Rearrangements des Immunglobulinschwerkettengenlocus derselben Kohorte niedriger. Die Mutationsfrequenz des IgH-Genlocus betrug im Mittel 1,29%. Dies deckt sich mit den Daten einer

Untersuchung von 96 MCL-Patienten, in der eine mittlere Mutationsfrequenz von 1,89% bei IgH-Rearrangements gefunden wurden (Camacho et al. 2003). In den Ig κ -Gensequenzen der Kohorte der vorliegenden Arbeit betrug die Mutationsfrequenz 0,28%. Die Beobachtung der niedrigen Mutationsfrequenz von Ig κ ist für ein Prä-Keimzentrums-Lymphom zu erwarten. Sie deckt sich mit der Annahme, dass ein Ausschalten des Ig κ -Gens im Rahmen der Rekombination und dadurch der Verlust der Ig κ -Enhancer diesen Genort von weiteren somatischen Mutationen ausschließt. Dies bedeutet einen potentiellen Vorteil für die Stabilität des molekularen Markers über einen langen Zeitraum aufgrund des Fehlens von somatischen Hypermutationen. Monoklonale Rekombinationen von Ig κ sind damit prinzipiell ein sehr stabiler MRD-Marker.

4.4 MRD-Analyse mit RQ-PCR und deren Limitationen

Die vergleichende Analyse einer Ig κ -RQ-PCR zur Bestimmung des MRD-Niveaus beim MCL durch Nutzung klonaler Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa konnte in dieser Arbeit nur bei einem kleinen Teil der Patienten durchgeführt werden. Die Ursache dafür sowie den Ablauf der Untersuchungen und die jeweils zugehörige Anzahl an Patienten zeigt Abbildung 21.

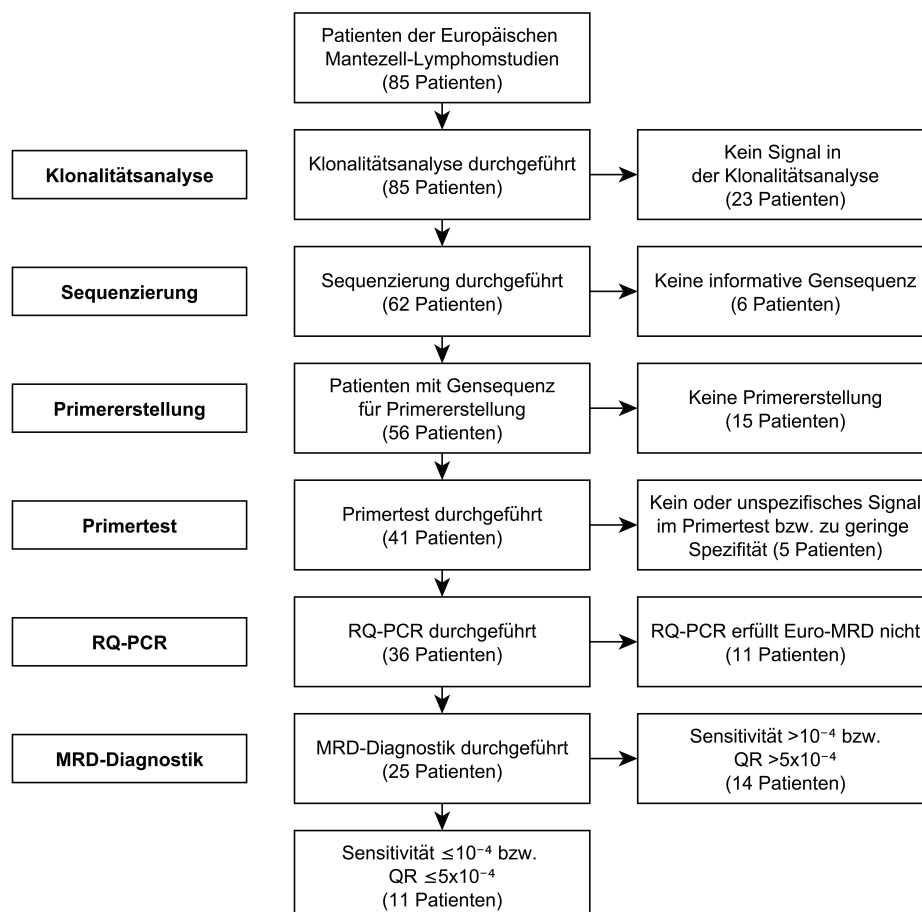


Abbildung 21: Flussdiagramm zum Ablauf der Untersuchungen dieser Arbeit mit Anzahl der jeweils zugehörigen Patienten. Dargestellt sind die Anzahl der Patienten bei den einzelnen Untersuchungsschritten sowie die Anzahl und der Grund der pro Untersuchungsschritt ausgefallenen Patienten.

RQ-PCR - real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion, MRD - Minimale Resterkrankung, Euro-MRD - technische Qualitätskriterien der European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology für die MRD-Diagnostik.

Von insgesamt 85 untersuchten Patienten lieferten 23 kein klonales Signal in der Klonalitätsanalyse. Von den verbliebenen 62 Patienten konnte für sechs keine informative Gensequenz generiert werden. Für 41 Patienten wurden Primer designed. Fünf dieser Patienten konnten aufgrund fehlender oder unspezifischer Signale im Primertest bzw. aufgrund eines zu geringen Abstandes zwischen Signal des Primärmaterials und Signal des polyklonalen Hintergrundes nicht weiter untersucht werden. Bei den verbliebenen 36 Patienten wurde eine RQ-PCR durchgeführt. Von diesen 36 Patienten erfüllten 25 die Anforderungen der Euro-MRD Kriterien und waren damit prinzipiell für eine MRD-Diagnostik geeignet; neun Patienten erfüllten die Kriterien wegen einer nicht akzeptierten Steigung der Regressionsgerade nicht, bei zwei Patienten lagen zu wenige auswertbare Verdünnungsstufen vor.

Um eine gewisse Güte der MRD-Diagnostik und eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der etablierten MRD-Marker zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit ein zusätzliches Qualitätskriterium angelegt: Die patientenspezifischen Assays sollten in der RQ-PCR eine Sensitivität von mindestens 10^{-4} oder einen QR von mindestens 5×10^{-4} erreichen. Dies war bei den elf Patienten der Fall, die letztendlich auf MRD untersucht wurden.

Auf der einen Seite sind klonale Ig κ -Rearrangements also mit einer hohen und den etablierten Markern vergleichbaren Rate per PCR detektierbar, was den prinzipiellen Nutzen von Ig κ für die Diagnostik unterstreicht. Andererseits ließen sich letztlich nur für einen kleinen Teil der untersuchten Patienten valide MRD-Daten generieren, da ein Teil der patientenspezifischen Assays die in dieser Arbeit festgelegten Anforderungen an Sensitivität oder QR nicht erfüllten. Der Anteil der Assays, die die Euro-MRD Kriterien erfüllten (25 von 41 Patienten, für die Primer designed wurden), wurde durch die genannten Anforderungen auf elf Patienten mehr als halbiert. Es zeigt sich also ein Unterschied in den Ergebnissen zwischen Detektierbarkeit klonaler Rearrangements auf der einen und Erfüllen der Qualitätskriterien und damit Möglichkeit zur validen MRD-Diagnostik auf der anderen Seite.

Die zugrundeliegende Ursache der Einschränkungen in Bezug auf die MRD-Diagnostik ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit vor allem in der geringen Länge bzw. Variabilität der N-Regionen, insbesondere der kleinen Anzahl von Insertionen zu sehen. Dies führte dazu, dass sich diese klonspezifische Genregion, für die der patientenspezifische Primer designed wurde, nicht ausreichend vom polyklonalen Hintergrund der anderen kernhaltigen Zellen unterschied. Der polyklonale Hintergrund wurde darum in den meisten Fällen vom patientenspezifischen Primer ebenfalls amplifiziert.

Um einen spezifischen RQ-PCR-Assay etablieren zu können, wird der polyklonale Hintergrund im Idealfall überhaupt nicht oder erst sehr spät amplifiziert. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn sich die Gensequenz, für die der Primer designed wurde, möglichst stark von den entsprechenden Gensequenzen des polyklonalen Hintergrunds unterscheidet. B-Zell-Malignome mit einer höheren Mutationsrate, einem ausgeprägteren Auftreten von Insertionen und Deletionen im Rahmen der Rekombination der Immunglobulingene und damit einer größeren Länge der spezifischen N-Region zeigen typischerweise

eine sich stärker vom polyklonalen Hintergrund unterscheidende Gensequenz. Entsprechend konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen der Länge der N-Region und der damit verbundenen Verschiedenheit der Ig κ -Rekombinationsstellen auf der einen und der Sensitivität und damit der Eignung des Markers für die MRD-Diagnostik auf der anderen Seite hergestellt werden.

Ein weiterer Aspekt sind die am Rearrangement beteiligten Genfamilien. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bestehen deutliche Unterschiede in der Nutzungsfrequenz der beteiligten Genfamilien, welche sich mit den Nutzungsfrequenzen bei gesunden B-Zellen decken. Das Auftreten einer Hintergrundamplifikation ist als umso wahrscheinlicher anzunehmen, je häufiger eine Genfamilie bei der Rekombination verwendet wird. Aufgrund der größeren Zahl der Gensequenzen der Genfamilie im polyklonalen Hintergrund dürfte die Wahrscheinlichkeit einer zufällig zum ASO-Primer passenden Rekombination und damit einer Amplifikation erhöht sein.

4.5 Einfluss der N-Regionen auf die MRD-Diagnostik und Vergleich mit anderen Entitäten

In der vorliegenden Arbeit betrug die mediane Länge der N-Regionen 0 bp (Mittelwert 1,6 bp) für Ig κ -J κ - und 2 bp (Mittelwert 2,1 bp) für Ig κ -KDE-Rearrangements. Die Anzahl der Deletionen betrug 2,7 bp stromauf- bzw. 2,8 bp stromabwärts der N-Region. Eine Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ wurde in der vorliegenden Arbeit bei zehn der 36 mit RQ-PCR untersuchten Patienten erreicht (28%), bzw. der 25 Patienten, deren Assays die Euro-MRD Kriterien erfüllten (40%).

Kurze N-Regionen von Ig κ -Rearrangements sind bei gesunden B-Zellen in einem vergleichbaren Umfang wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben worden: 0-1 bp bei Victor et al., 0-3 bp in fast 90% bei Foster et al. (Victor et al. 1994; Foster et al. 1997). Auch die von Foster et al. berichteten Deletionen sind zu denen des MCL vergleichbar (3,2 bp). In einer anderen Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe zeigte sich, dass in der gleichen Population von gesunden peripheren B-Zellen die Länge der N-Regionen im rekombinierten IgH-Gen im Median 12-19 bp betrug (Brezinschek et al. 1997). Je nach betrachtetem Immunglobulingen bestehen bei gesunden B-Zellen also deutliche Unterschiede in der Länge der N-Regionen und der Deletionen. Ig κ weist eine geringere Diversität im Bereich der Rekombinationsstelle im Vergleich zu IgH auf. Dies wird in Verbindung gebracht mit der Herunterregulation der Aktivität der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) sowie einer verminderten Aktivität von Exonukleasen nach der Rekombination der Immunglobulinschwerkette (Victor et al. 1994; Foster et al. 1997). Es handelt sich demnach bei fehlenden oder kurzen N-Regionen nicht um ein Charakteristikum des MCL sondern um eine biologische Eigenschaft von Ig κ .

Ig κ -Rearrangements mit N-Regionen von vergleichbarer Länge wie in der vorliegenden Arbeit wurden bei der B-CLL (1,7 bp bei Henopp, 1,9 bp bei Beishuizen et al.) und dem Multiplen Myelom (1 bp bei Puig et al.) beschrieben (Henopp 2006; Beishuizen et al. 1997; Puig et al. 2012). Bei diesen Entitäten lag der Anteil der Assays, die eine Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ erreichten, unter 50% der Anzahl der durchgeführten RQ-PCRs bzw. der Assays, die die Euro-MRD Kriterien erfüllten (28% bzw. 40% in der vorliegenden Arbeit, 10% bei Henopp, 40% bzw. 50% bei Puig et al.; für die B-CLL keine Daten berichtet bei Beishuizen et al.). Wie

auch in der vorliegenden Arbeit führten die kurzen N-Regionen über eine zu geringe Spezifität des Primers zu einer Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (90% bei Ig κ -J κ bzw. 87% bei Ig κ -KDE in dieser Arbeit, 83% bei der B-CLL, 81% beim Multiplen Myelom). Die Ergebnisse für die B-CLL und das Multiple Myelom sind also mit denen des MCL vergleichbar, was die Länge der N-Regionen, die Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes und die Sensitivität der RQ-PCR anbelangt. Es zeigt sich dabei für alle Entitäten eine eingeschränkte Nutzbarkeit klonaler Ig κ -Rearrangements für die MRD-Diagnostik bezogen auf den Anteil der quantifizierbaren Patienten.

Die mediane Länge der N-Regionen der in der vorliegenden Arbeit erfolgreich auf MRD untersuchbaren Patienten betrug 4 bp (Mittelwert 5 bp) und war damit deutlich länger als der Gesamt-Median aller in dieser Arbeit identifizierten N-Regionen. Ähnlich lange N-Regionen werden in der Literatur vor allem für die (Präkursor-)B-ALL beschrieben (4 bp bei Henopp, 4,7 bp bei Beishuizen, 4,8 bp und 4,9 bp bei van der Velden) (Henopp 2006; Beishuizen et al. 1997; van der Velden et al. 2002; van der Velden et al. 2006). Bei den Deletionen ergibt sich kein eindeutiges Bild, da für die B-ALL neben ausgeprägteren Deletionen auch solche vergleichbaren Umfangs wie bei den anderen genannten Entitäten beschrieben sind.

Eine Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ wurde in den genannten Arbeiten zur B-ALL bei deutlich über 50% der Assays erreicht (68 % bei Henopp, 79% bei Beishuizen et al., 89% bzw. 82% bei van der Velden et al.). Es liegt also nahe, generell einen Zusammenhang zwischen Länge der N-Region und Sensitivität der MRD-Diagnostik zu vermuten.

Bei der B-ALL werden klonale Rearrangements von Ig κ bereits in einem hohen Maße erfolgreich zur MRD-Diagnostik eingesetzt (van der Velden et al. 2002). Der Unterschied in der Charakteristik von Ig κ bei der B-ALL im Gegensatz zu anderen B-Zell-Malignomen liegt unter anderem darin, dass bei der B-ALL deutlich längere N-Regionen und umfangreichere Deletionen im Bereich der Rekombinationsstellen vorkommen. Dadurch ist von einer stärkeren Unterscheidbarkeit der durch Rekombination entstandenen Gensequenzen im Vergleich zum polyklonalen Hintergrund der zirkulierenden B-Zellen auszugehen. Beishuizen et al. vermuten, dass die TdT, die für das Einfügen von zufälligen Nukleotiden in der junktionalen Region bei der Rekombination der Immunglobulingene verantwortlich ist, bei der Präkursor-B-ALL während des Ig κ -Rearrangements weiterhin aktiv ist und so zu längeren N-Regionen führt. Im Gegensatz dazu sprächen die kurzen N-Regionen bei der B-CLL für eine verminderte Aktivität der TdT (Beishuizen et al. 1997).

In der genannten Arbeit von Beishuizen et al. wurde allerdings kein sicherer Zusammenhang zwischen der Länge der N-Region bzw. der Anzahl der Deletionen und der Sensitivität der Assays hergestellt. Die Autoren konnten auch bei Fällen mit langer N-Region und vielen Deletionen eine Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes beobachten; umgekehrt konnte auch bei Fällen mit kurzer N-Region und wenigen Deletionen eine sehr gute Sensitivität erreicht werden. Allerdings wurde in der Arbeit nur für insgesamt 14 Patienten eine RQ-PCR durchgeführt. Auch in den Arbeiten von van der Velden et al. zeigte sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Länge der N-Region oder der Anzahl der Deletionen und der Sensitivität des Assays. Ein solcher Zusammenhang ließ sich aber möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl der in den genannten Arbeiten durchgeführten RQ-PCRs nicht nachweisen (18 bzw. 11

RQ-PCRs im Vergleich zu 36 Patienten mit 40 RQ-PCRs in der vorliegenden Arbeit). Die Autoren vermuteten andere Faktoren, die die Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes hervorgerufen haben könnten. Denkbar wäre zum Beispiel, dass repetitive Nukleotidabfolgen in der Sequenz des ASO-Primers die Spezifität der Bindung negativ beeinflussen.

Eine Zwischenstellung in den bis hierhin genannten Literaturdaten nimmt eine Untersuchung ein, die Patienten mit reifer B-ALL und pädiatrischem Burkitt-Lymphom (BL) unter Nutzung klonaler Rearrangements von IgH und Ig κ auf MRD untersuchte (Lovisa et al. 2009). Die Länge der N-Regionen der Ig κ -Rearrangements betrug 1-2 bp, sofern überhaupt N-Regionen vorhanden waren. Die Sensitivität lag für IgH mit mindestens 10^{-4} in >90% der Fälle deutlich besser als für Ig κ (mit ca. 50% für Ig κ -KDE bzw. ca. 70% für Ig κ -J κ .) Die Ergebnisse für Ig κ -KDE waren damit vergleichbar, die für Ig κ -J κ jedoch trotz kurzer N-Regionen deutlich besser im Vergleich zu denen der vorliegenden Arbeit und lagen eher im Bereich der für die B-ALL berichteten Ergebnisse. Eine Übersicht über die Ergebnisse der diskutierten Arbeiten gibt Tabelle 25.

Tabelle 25: Übersicht über Publikationen zu Ig κ -Rearrangements bei verschiedenen Entitäten.

Deletionen je nach Datengrundlage für 5'- bzw. 3'-Ende oder gemittelt.

*: Anzahl der Fälle bzw. Anteil an Fällen mit RQ-PCR bzw. Erfüllen der Euro-MRD Kriterien (in Klammern, sofern berichtet); #: Median; °: selektionierte Fälle mit bekanntem Nachweis von KDE-Rearrangements im southern blot; n.b.: nicht berichtet; n.u.: nicht untersucht.

MCL – Mantelzell-Lymphom; B-CLL - chronische lymphatische B-Zell-Leukämie; B-ALL - akute lymphatische B-Zell-Leukämie; MM - Multiples Myelom; BL - Burkitt Lymphom; Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa; J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa; KDE - kappa deleting element; IgM⁺ - Immunglobulin M positiv; bp - Basenpaar(e); PCR - Polymerasekettenreaktion; RQ-PCR - real-time quantitative Polymerasekettenreaktion.

| Publikation/ Arbeit | Entität | n | Marker | PCR- Klonalität | N-Region | Deletion | RQ-PCR (Euro- MRD)* | Sensitivität ≤ 10^{-4} * |
|-------------------------|--|------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|
| vorliegende Arbeit | MCL | 85 | Ig κ -J κ | 57,6% | 1,6 bp | 2,5 bp, 1,5 bp | 36 (25) | 28% (40%) |
| | | | Ig κ - KDE | 48,2% | 2,1 bp | 2,8 bp, 4,1 bp | | |
| Victor et al. (1994) | gesunde B- Zellen | 143 | Ig κ | n.u. | 90% 0 bp, 10% 1 bp | n.b. | n.u. | n.u. |
| Foster et al. (1997) | gesunde IgM ⁺ B- Zellen | >600 | Ig κ | n.u. | 38% 0 bp, 48% 1-3 bp, 14% >3 bp | 3,2 bp | n.u. | n.u. |
| Henopp (2006) | B-CLL | 69 | Ig κ - KDE | 26% | 1,7 bp | 1,8 bp, 4,3 bp | 21 | 10% |
| | B-ALL | 28 | Ig κ - KDE | n.b. | 4 bp | 4 bp, 4 bp | 22 | 68% |

| Publikation/ Arbeit | Entität | n | Marker | PCR- Klonalität | N-Region | Deletion | RQ-PCR (Euro- MRD)* | Sensitivität ≤ 10 ⁻⁴ * |
|---------------------------------|---------------------|-----|-------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Puig et al. (2012) | MM | 96 | Igκ- KDE | 45% | 1 bp [#] | 5 bp [#] | 10 (8) | 40% (50%) |
| Beishuizen et al. (1997) | Präkursor- B-ALL | 63° | Igκ- KDE | 100% | 4,7 bp | 9,5 bp | 14 | 79% |
| | B-CLL | 67° | Igκ- KDE | 100% | 1,9 bp | 6,0 bp | n.b. | n.b. |
| van der Velden et al. (2002) | Präkursor- B-ALL | 110 | Igκ- KDE | 91% | 4,8 bp | 9,8 bp | 18 | 89% |
| van der Velden et al. (2006) | Präkursor- B-ALL | 156 | Igκ- Jκ | 30% | 4,9 bp | 5,1 bp, 3,0 bp | 11 | 82% |
| Lovisa et al. (2009) | reife B- ALL, | 55 | Igκ- Jκ | n.b. | 1-2 bp | n.b. | 33 Igκ-Jκ | 70% |
| | pädiatr. BL | | Igκ- KDE | | | | 19 Igκ- KDE | 50% |

4.6 Weitere Einflussfaktoren auf die MRD-Diagnostik

Die Ergebnisse der MRD-Diagnostik in der vorliegenden Arbeit wurden zum großen Teil von der Länge der N-Regionen bestimmt. Es scheint jedoch so zu sein, dass die Länge der N-Region nur einer der Faktoren ist, die Sensitivität und QR des patientenspezifischen Assays beeinflussen. Eine mögliche Ursache guter Ergebnisse trotz kurzer N-Regionen könnte das Vorhandensein von anderen distinkten Merkmalen der Gensequenz der Rekombinationsregion sein. Ein Beispiel dafür könnten Basenmutationen sein. Denkbar ist, dass durch diese Mutationen die Diversität der Gensequenz von der Keimbahnsequenz zunimmt. Allerdings bergen Mutationen auch die Gefahr, dass die Bindungssequenzen für die Sonde und den zweiten Primer des patientenspezifischen Assays betroffen sind und damit keine PCR-Reaktion mit den Standard-Primern bzw. den Standard-Sonden möglich wäre. Eine Lösung hierfür wäre die Sequenzierung des gesamten Genabschnitts zur Identifikation mutierter Basen und das Design einer ASO-Sonde bzw. eines zweiten ASO-Primers. Diese würden dann trotz mutierter Gensequenz eine RQ-PCR ermöglichen, da sie anders als Konsensus-Primer oder -Sonde an die mutierte Zielsequenz binden könnten.

Auch der Umfang von Deletionen im Bereich der Rekombinationsstelle dürfte einen Einfluss auf die Ergebnisse der RQ-PCR haben. Dieser scheint jedoch nicht so ausgeprägt wie der der Länge der N-Regionen zu sein.

Eine weitere Ursache der häufig zu beobachtenden Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes könnten repetitive Nukleotidabfolgen in der Sequenz des Primers sein, wie es u.a. von van der Velden et al. bereits vermutet wurde (van der Velden et al. 2002; van der Velden et al. 2006). Diese könnten in einer

geringen Spezifität der Primersequenz und damit letztlich in der Bindung an die DNA resultieren. Als mögliche Lösung für diese Fälle wurde ebenfalls von van der Velden et al. vorgeschlagen, eine ASO-Sonde oder einen ASO-Rückwärtsprimer zu designen.

Auch die Anforderungen an das Primerdesign könnten eine Hintergrundamplifikation begünstigen, wenn man zum Beispiel aufgrund der Gensequenz gezwungen ist einen Primer zu erstellen, der nur wenige Basenpaare über die N-Region hinausreicht. Eine fehlende N-Region ohne Deletionen zusammen mit einem nur sehr kurz über die Rekombinationsstelle hinausreichenden Primer dürfte sehr wahrscheinlich zu einer Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes führen.

Eine weitere Möglichkeit, die Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes zu verhindern bzw. zu verzögern und damit Sensitivität und QR zu verbessern, ist die Erhöhung der Annealing-Temperatur. In der vorliegenden Arbeit wurde die Annealing-Temperatur der Assays mit kleinem ΔC_t zwischen Primärmaterial und polyklonalem Hintergrund testweise von 59°C auf 61°C und 63°C erhöht. Dieser Ansatz erbrachte allerdings keine Verringerung der Bindung des Primers an den polyklonalen Hintergrund und damit der Amplifikation desselben.

4.7 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse bei Nutzung klonaler Rearrangements der Immunglobulinleichtkette kappa in 13% der Fälle denen der etablierten Marker vergleichbar sind. Insbesondere konnte bei vier der elf quantifizierbaren Patienten erstmals die Darstellung des MRD-Niveaus mit einem zweiten Marker erfolgen. Den elf Patienten gemeinsam war dabei eine längere N-Region im Vergleich zu den Patienten, bei denen keine MRD-Diagnostik durchgeführt werden konnte. Der Erfolg einer Nutzung klonaler Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa als MRD-Marker beim MCL ist also größer bei den Patienten, die über eine längere N-Region verfügen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Länge der N-Region von mindestens 4 bp zu signifikant besseren und zu denen der B-ALL vergleichbaren Ergebnissen führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass klonale Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa trotz der Limitationen für die Untersuchung auf Minimale Resterkrankung bei Patienten mit MCL geeignet sind. In der Patientenkohorte dieser Arbeit gelang dies bei 13% der Patienten, deren patientenspezifische Assays eine den etablierten Markern vergleichbare Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ bzw. einen QR von $\leq 5 \times 10^{-4}$ erreichten. Darüber hinaus kann Ig κ als zweiter Marker eine sinnvolle Ergänzung sein, wenn von den beiden etablierten Markern keiner oder nur einer verwertbare Ergebnisse erbringt. Dies gilt umso mehr, wenn geringere Anforderungen z.B. an die Sensitivität gestellt werden. Akzeptiert man beispielsweise eine Sensitivität von $\leq 5 \times 10^{-4}$, so steigt der Anteil der mit klonalen Ig κ -Rearrangements auf MRD untersuchbaren Patienten auf 25% aller untersuchten Patienten bzw. 84% der Patienten, für die eine RQ-PCR durchgeführt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Moderne Behandlungsregime von malignen B-Zell-Erkrankungen führen in einem hohen Maße zu klinischen Remissionen. Erfahrungen zeigen aber, dass viele Patienten trotz initialem Erreichen einer Remission im Laufe ihrer Erkrankung ein Rezidiv erleiden. In diesem Zusammenhang hat die Diagnose der Minimalen Resterkrankung (MRD) durch molekulargenetische Methoden wie der real-time quantitative PCR als therapiebegleitende und -überwachende Maßnahme in den letzten Jahren immens an Stellenwert gewonnen. Im Falle des Mantelzell-Lymphoms erleiden nahezu alle Patienten ein Rezidiv. Darum ist es in besonderem Maße vonnöten, eine Überwachung der Erkrankung auch in klinischer Remission gewährleisten zu können.

Bei der Diagnose der Minimalen Resterkrankung verschiedener hämatologischer Neoplasien sind klonale Rearrangements des Immunglobulinschwerkettengens (IgH), der Immunglobulinleichtkettengene kappa und lambda, der T-Zell-Rezeptorgene und spezifischer Chromosomentranslokationen valide Ziele quantitativer PCR-basierter Verfahren. Zur Überwachung der Erkrankung und als Grundlage für Therapieentscheidungen werden idealerweise zwei dieser genetischen Marker parallel genutzt, um zum Beispiel der Gefahr von falsch-positiven oder -negativen Ergebnissen Rechnung zu tragen.

In der Diagnostik der Minimalen Resterkrankung beim Mantelzell-Lymphom werden die beiden etablierten Marker IgH und die für das Mantelzell-Lymphom spezifische Translokation t(11;14) genutzt. In bis zu 10% der Fälle liefern diese Marker jedoch kein oder kein ausreichendes Ergebnis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, inwiefern klonale Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa (Ig κ) als mögliche molekulargenetische Marker für die Untersuchung auf MRD beim Mantelzell-Lymphom eingesetzt werden können. Aufgrund der besonderen Anlage des betrachteten Genabschnitts und der Besonderheiten bei der Rekombination der Gene wurden zwei Gruppen von Veränderungen untersucht. Zum einen die, bei denen durch eine erfolgreiche Rekombination der Variable- und Joining-Genregionen des Immunglobulinleichtkettengens kappa ein potentiell funktionstüchtiger Genabschnitt erzeugt wurde (V κ -J κ -Rearrangement). Zum anderen die, bei denen eine Rekombination der V κ -Genregion bzw. der recombination signal sequence im Intron, das distal der J κ -Segmente liegt, an das kappa deleting element zu einem Ausschalten des Gens der Immunglobulinleichtkette kappa geführt hat (V κ - bzw. Intron/RSS-KDE- Rearrangement). Ein Patient kann dabei pro Allel zwei, insgesamt also bis zu vier Rearrangements aufweisen.

Die DNA von 85 Patienten, von denen im Rahmen der Studien des Europäischen Mantelzell-Lymphom Netzwerks zur Behandlung älterer bzw. jüngerer Patienten DNA aus Blut- und/oder Knochenmarkproben asserviert worden war, wurden auf Klonalität analysiert. Dabei zeigten sich bei 62 der 85 Patienten (72,9%) klonale Signale. Bei der anschließenden Sequenzierung konnten von 56 Patienten verwertbare Sequenzen gewonnen werden. Nach Analyse und Auswahl der Sequenzen wurden 67 patientspezifische Primer für 41 Patienten entworfen und in aufeinander folgenden Durchgängen getestet. Bei den Ergebnissen von V κ -J κ hatte sich in den ersten Durchgängen eine große Anzahl von fehlenden Fluoreszenzsignalen in der Primertestung trotz guter Gensequenz gezeigt, sodass hier am ehesten von einem

technischen Problem z.B. der Sonde auszugehen war. In den späteren Durchgängen wurden deswegen vorrangig KDE-Rekombinationen untersucht.

Es wurden Ergebnisse erhoben im Hinblick auf die Sensitivität, den quantitativen Messbereich (in dem eine Quantifizierung residueller Lymphomzellen möglich ist) und die unspezifische Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes der patientenspezifischen Assays. Dabei zeigte sich bei den hier untersuchten Markern $V\kappa-J\kappa$ und $V\kappa$ - bzw. Intron/RSS-KDE im Vergleich zu den bekannten Ergebnissen der etablierten Marker IgH und t(11;14) eine Unterlegenheit in allen drei Größen. Lediglich für 25 Patienten, deren Ergebnisse den technischen Qualitätskriterien der European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology entsprachen, konnte eine MRD-Diagnostik durchgeführt werden. Durch die Hinzunahme zusätzlicher Kriterien (einer Sensitivität von $\leq 10^{-4}$ und eines ausreichend großen quantitativen Messbereich von $\leq 5 \times 10^{-4}$) sank diese Anzahl auf elf Patienten.

Die ungenügenden Ergebnisse der restlichen Assays ließen sich auf eine zu geringe Variabilität der Rekombinationsregion, insbesondere auf die kurzen N-Regionen und eine geringe Anzahl von Deletionen zurückführen. Auch die Mutationsrate war mit 0,28% sehr niedrig. Insgesamt ergab sich dadurch häufig eine zu geringe Diversität der klonalspezifischen Gensequenz zum polyklonalen Hintergrund, wie er durch andere kernhaltige Zellen hervorgerufen wird. Die erfolgreiche MRD-Diagnostik der elf Patienten zeigte jedoch, dass die Ergebnisse in 13% der Fälle denen der etablierten Marker vergleichbar waren. Bei vier Patienten konnte erstmals das MRD-Niveau mit einem zweiten Marker erfasst werden.

Die Nutzung klonaler Rearrangements des Immunglobulinleichtkettengens kappa dürfte für die MRD-Diagnostik beim Mantelzell-Lymphom aufgrund der geringeren genetischen Variabilität nicht den gleichen Stellenwert erreichen, den sie zum Beispiel bei der akuten lymphatischen Leukämie hat. Es konnte aber gezeigt werden, dass die quantitative PCR unter Nutzung klonaler Ig κ -Rearrangements bei Patienten mit Mantelzell-Lymphom trotz der genannten Einschränkungen den etablierten Markern gleichwertige Ergebnisse bei der Detektion der Minimalen Resterkrankung erbringen kann. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn die Gensequenzen der Ig κ -Rekombinationen eine ausreichende Variabilität aufweisen. Im Falle schwächerer Ergebnisse von Ig κ ist eine ergänzende Nutzung als zweiter Marker zu einem Marker mit besserer Sensitivität und quantitativem Messbereich denkbar. Mit reduzierten Anforderungen an Sensitivität und quantitativen Messbereich wäre das dann auch für einen deutlich größeren Anteil Mantelzell-Lymphom-Patienten möglich.

6. Literaturverzeichnis

- Agarwal, R.; Dawson, M. A.; Dreyling, M.; Tam, C. S. (2018): Understanding resistance mechanisms to BTK and BCL2 inhibitors in mantle cell lymphoma: implications for design of clinical trials. *Leukemia & Lymphoma*, 59, 2769-2781
- Banks, P. M.; Chan, J.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; De Wolf-Peeters, C.; Gatter, K.; Grogan, T. M.; Harris, N. L.; Isaacson, P. G.; Jaffe, E. S.; et al. (1992): Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*, 16, 637-640
- Bassan, R.; Spinelli, O.; Oldani, E.; Intermesoli, T.; Tosi, M.; Peruta, B.; Rossi, G.; Borlenghi, E.; Pogliani, E. M.; Terruzzi, E.; Fabris, P.; Cassibba, V.; Lambertenghi-Delilieri, G.; Cortelezzi, A.; Bosi, A.; Gianfaldoni, G.; Ciceri, F.; Bernardi, M.; Gallamini, A.; Mattei, D.; Di Bona, E.; Romani, C.; Scattolin, A. M.; Barbui, T.; Rambaldi, A. (2009): Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, 113, 4153-4162
- Beishuizen, A.; de Bruijn, M. A.; Pongers-Willems, M. J.; Verhoeven, M. A.; van Wering, E. R.; Hahlen, K.; Breit, T. M.; de Bruin-Versteeg, S.; Hooijkaas, H.; van Dongen, J. J. (1997): Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias: a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 11, 2200-2207
- Böttcher, S.; Ritgen, M.; Buske, S.; Gesk, S.; Klapper, W.; Hoster, E.; Hiddemann, W.; Unterhalt, M.; Dreyling, M.; Siebert, R.; Kneba, M.; Pott, C. (2008): Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica*, 93, 551-559
- Brezinschek, H. P.; Foster, S. J.; Brezinschek, R. I.; Dörner, T.; Domiati-Saad, R.; Lipsky, P. E. (1997): Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest*, 99, 2488-2501
- Brüggemann, M.; Droese, J.; Bolz, I.; Luth, P.; Pott, C.; von Neuhoff, N.; Scheuring, U.; Kneba, M. (2000): Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*, 14, 1419-1425
- Brüggemann, M.; Gökbuget, N.; Kneba, M. (2012): Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol*, 39, 47-57
- Brüggemann, M.; Pott, C.; Ritgen, M.; Kneba, M. (2004): Significance of minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Acta Haematol*, 112, 111-119

Brüggemann, M.; Raff, T.; Kneba, M. (2012): Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*, 120, 4470-4481

Callanan, M. B.; Delfau, M.-H.; Macintyre, E.; Thieblemont, C.; Oberic, L.; Gyan, E.; Bouabdallah, K.; Gressin, R.; Damaj, G.; Casasnovas, O.; Ribrag, V.; Gimenez, E.; Hermine, O.; Le Gouill, S. (2015): Predictive power of early, sequential MRD monitoring in peripheral blood and bone marrow in patients with mantle cell lymphoma following autologous stem cell transplantation with or without rituximab maintenance; interim results from the LyMa-MRD project, conducted on behalf of the Lysa group. *Blood*, 126, 338-338

Camacho, F. I.; Algara, P.; Rodriguez, A.; Ruiz-Ballesteros, E.; Mollejo, M.; Martinez, N.; Martinez-Clement, J. A.; Gonzalez, M.; Mateo, M.; Caleo, A.; Sanchez-Beato, M.; Menarguez, J.; Garcia-Conde, J.; Sole, F.; Campo, E.; Piris, M. A. (2003): Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*, 101, 4042-4046

Cohen, J. (1992): Statistical Power Analysis. *Current Directions in Psychological Science*, 1, 98-101

Du, M. Q.; Diss, T. C.; Xu, C. F.; Wotherspoon, A. C.; Isaacson, P. G.; Pan, L. X. (1997): Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. *Br J Haematol*, 96, 124-131

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. C.; 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, 207-214

Foster, S. J.; Brezinschek, H. P.; Brezinschek, R. I.; Lipsky, P. E. (1997): Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest*, 99, 1614-1627

Ghia, P.; ten Boekel, E.; Rolink, A. G.; Melchers, F. (1998): B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today*, 19, 480-485

Gökbuget, N.; Kneba, M.; Raff, T.; Brüggemann, M.; Scheuring, U.; Reutzel, R.; Hoelzer, D. (2002): Risk-adapted treatment according to minimal residual disease in adult ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*, 15, 639-652

Gökbuget, N.; Kneba, M.; Raff, T.; Trautmann, H.; Bartram, C. R.; Arnold, R.; Fietkau, R.; Freund, M.; Ganser, A.; Ludwig, W. D.; Maschmeyer, G.; Rieder, H.; Schwartz, S.; Serve, H.; Thiel, E.; Brüggemann, M.; Hoelzer, D. (2012): Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a

poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*, 120, 1868-1876

Harel, S.; Delarue, R.; Ribrag, V.; Dreyling, M.; Hermine, O. (2011): Treatment of younger patients with mantle cell lymphoma. *Semin Hematol*, 48, 194-207

Harris, N. L.; Nadler, L. M.; Bhan, A. K. (1984): Immunohistologic characterization of two malignant lymphomas of germinal center type (centroblastic/centrocytic and centrocytic) with monoclonal antibodies. Follicular and diffuse lymphomas of small-cleaved-cell type are related but distinct entities. *Am J Pathol*, 117, 262-272

Henopp, T. (2006): Nachweis klonal rearrangierter Immunglobulin Kappa deleting elements bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und deren Eignung zur molekularen Quantifizierung der minimalen Resterkrankung (MRD). *Med. Diss., Kiel*

Hermine, O.; Hoster, E.; Walewski, J.; Bosly, A.; Stilgenbauer, S.; Thieblemont, C.; Szymczyk, M.; Bouabdallah, R.; Kneba, M.; Hallek, M.; Salles, G.; Feugier, P.; Ribrag, V.; Birkmann, J.; Forstpointner, R.; Haioun, C.; Hänel, M.; Casasnovas, R. O.; Finke, J.; Peter, N.; Bouabdallah, K.; Sebban, C.; Fischer, T.; Dührsen, U.; Metzner, B.; Maschmeyer, G.; Kanz, L.; Schmidt, C.; Delarue, R.; Brousse, N.; Klapper, W.; Macintyre, E.; Delfau-Larue, M.-H.; Pott, C.; Hiddemann, W.; Unterhalt, M.; Dreyling, M. (2016): Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *The Lancet*, 388, 565-575

Herrmann, A.; Hoster, E.; Zwingers, T.; Brittinger, G.; Engelhard, M.; Meusers, P.; Reiser, M.; Forstpointner, R.; Metzner, B.; Peter, N.; Wormann, B.; Trumper, L.; Pfreundschuh, M.; Einsele, H.; Hiddemann, W.; Unterhalt, M.; Dreyling, M. (2009): Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 27, 511-518

Hoster, E.; Dreyling, M.; Klapper, W.; Gisselbrecht, C.; van Hoof, A.; Kluin-Nelemans, H. C.; Pfreundschuh, M.; Reiser, M.; Metzner, B.; Einsele, H.; Peter, N.; Jung, W.; Wormann, B.; Ludwig, W. D.; Dührsen, U.; Eimermacher, H.; Wandt, H.; Hasford, J.; Hiddemann, W.; Unterhalt, M. (2008): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, 111, 558-565

Hoster, E.; Klapper, W.; Hermine, O.; Kluin-Nelemans, H. C.; Walewski, J.; Hoof, A. v.; Trneny, M.; Geisler, C. H.; Raimondo, F. D.; Szymczyk, M.; Stilgenbauer, S.; Thieblemont, C.; Hallek, M.; Forstpointner, R.; Pott, C.; Ribrag, V.; Doorduijn, J.; Hiddemann, W.; Dreyling, M. H.; Unterhalt, M. (2014): Confirmation of the mantle-cell lymphoma international prognostic index in randomized trials of the european mantle-cell lymphoma network. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 1338-1346

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

Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Neumann, R.; Keyte, J. (1988): Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 10953-10971

Kahl, B. S.; Dreyling, M.; Gordon, L. I.; Martin, P.; Quintanilla-Martinez, L.; Sotomayor, E. M. (2019): Recent advances and future directions in mantle cell lymphoma research: report of the 2018 mantle cell lymphoma consortium workshop. *Leukemia & Lymphoma*, 60, 1853-1865

Kienle, D.; Kröber, A.; Katzenberger, T.; Ott, G.; Leupolt, E.; Barth, T. F. E.; Möller, P.; Benner, A.; Habermann, A.; Müller-Hermelink, H. K.; Bentz, M.; Lichter, P.; Döhner, H.; Stilgenbauer, S. (2003): VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, 102, 3003-3009

Kluin-Nelemans, H. C.; Hoster, E.; Hermine, O.; Walewski, J.; Trneny, M.; Geisler, C. H.; Stilgenbauer, S.; Thieblemont, C.; Vehling-Kaiser, U.; Doorduijn, J. K.; Coiffier, B.; Forstpointner, R.; Tilly, H.; Kanz, L.; Feugier, P.; Szymczyk, M.; Hallek, M.; Kremers, S.; Lepeu, G.; Sanhes, L.; Zijlstra, J. M.; Bouabdallah, R.; Lugtenburg, P. J.; Macro, M.; Pfreundschuh, M.; Prochazka, V.; Di Raimondo, F.; Ribrag, V.; Uppenkamp, M.; Andre, M.; Klapper, W.; Hiddemann, W.; Unterhalt, M.; Dreyling, M. H. (2012): Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 367, 520-531

Kolstad, A.; Pedersen, L. B.; Eskelund, C. W.; Husby, S.; Grønbaek, K.; Jerkeman, M.; Laurell, A.; Rätty, R.; Elonen, E.; Andersen, N. S.; Brown, P. d.; Kimby, E.; Bentzen, H.; Sundström, C.; Ehinger, M.; Karjalainen-Lindsberg, M.-L.; Delabie, J.; Ralfkiaer, E.; Fagerli, U.-M.; Nilsson-Ehle, H.; Lauritzsen, G. F.; Kuittinen, O.; Niemann, C.; Geisler, C. H. (2017): Molecular monitoring after autologous stem cell transplantation and preemptive rituximab treatment of molecular relapse; results from the nordic mantle cell lymphoma studies (MCL2 and MCL3) with median follow-up of 8.5 years. *Biol Blood Marrow Transplant*, 23, 428-435

Krsková, L.; Hilská, I.; Kopecká, P.; Soukup, J.; Kodet, R. (2004): Molecular diagnosis of malignant B-cell lymphoma: detection of clonality and a brief review of problems with our results. *Cas Lek Cesk*, 143, 191-194

Küppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M. L.; Rajewsky, K. (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 341, 1520-1529

- Langerak, A. W.; Nadel, B.; De Torbal, A.; Wolvers-Tettero, I. L.; van Gastel-Mol, E. J.; Verhaaf, B.; Jager, U.; van Dongen, J. J. (2004): Unraveling the consecutive recombination events in the human IGK locus. *J Immunol*, 173, 3878-3888
- Langerak, A. W.; van Dongen, J. J. (2006): Recombination in the human IGK locus. *Crit Rev Immunol*, 26, 23-42
- Le Gouill, S.; Thieblemont, C.; Oberic, L.; Moreau, A.; Bouabdallah, K.; Dartigeas, C.; Damaj, G.; Gastinne, T.; Ribrag, V.; Feugier, P.; Casasnovas, O.; Zerazhi, H.; Haioun, C.; Maisonneuve, H.; Houot, R.; Jardin, F.; Van Den Neste, E.; Tournilhac, O.; Le Dû, K.; Morschhauser, F.; Cartron, G.; Fornecker, L.-M.; Canioni, D.; Callanan, M.; Béné, M. C.; Salles, G.; Tilly, H.; Lamy, T.; Gressin, R.; Hermine, O. (2017): Rituximab after autologous stem-cell transplantation in mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 377, 1250-1260
- Lefranc, M. P. (2003): IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://www.imgt.org>. *Leukemia*, 17, 260-266
- Lennert, K.; Stein, H.; Kaiserling, E. (1975): Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl*, 2, 29-43
- Levy, V.; Ugo, V.; Delmer, A.; Tang, R.; Ramond, S.; Perrot, J. Y.; Vrhovac, R.; Marie, J. P.; Zittoun, R.; Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1999): Cyclin D1 overexpression allows identification of an aggressive subset of leukemic lymphoproliferative disorder. *Leukemia*, 13, 1343-1351
- Liu, H.; Johnson, J. L.; Koval, G.; Malnassy, G.; Sher, D.; Damon, L. E.; Hsi, E. D.; Bucci, D. M.; Linker, C. A.; Cheson, B. D.; Stock, W. (2012): Detection of minimal residual disease following induction immunochemotherapy predicts progression free survival in mantle cell lymphoma: final results of CALGB 59909. *Haematologica*, 97, 579-585
- Lovisa, F.; Mussolin, L.; Corral, L.; Pillon, M.; Cazzaniga, G.; Biondi, A.; Rosolen, A. (2009): IGH and IGK gene rearrangements as PCR targets for pediatric burkitt's lymphoma and mature B-ALL MRD analysis. *Lab Invest*, 89, 1182
- Martin, P.; Ghione, P.; Dreyling, M. (2017): Mantle cell lymphoma - Current standards of care and future directions. *Cancer Treat Rev*, 58, 51-60
- Matsuda, F.; Ishii, K.; Bourvagnet, P.; Kuma, K.; Hayashida, H.; Miyata, T.; Honjo, T. (1998): The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med*, 188, 2151-2162

Meusers, P.; Engelhard, M.; Bartels, H.; Binder, T.; Fulle, H. H.; Gorg, K.; Gunzer, U.; Havemann, K.; Kayser, W.; Konig, E.; et al. (1989): Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol*, 7, 365-380

Orchard, J.; Garand, R.; Davis, Z.; Babbage, G.; Sahota, S.; Matutes, E.; Catovsky, D.; Thomas, P. W.; Avet-Loiseau, H.; Oscier, D. (2003): A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*, 101, 4975-4981

Pongers-Willemse, M. J.; Seriu, T.; Stolz, F.; d'Aniello, E.; Gameiro, P.; Pisa, P.; Gonzalez, M.; Bartram, C. R.; Panzer-Grumayer, E. R.; Biondi, A.; San Miguel, J. F.; van Dongen, J. J. (1999): 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: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 13, 110-118

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

Pott, C. (2011): Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: technical aspects and clinical relevance. *Semin Hematol*, 48, 172-184

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.; Trneny, M.; Walewski, J.; Dreger, P.; Unterhalt, M.; Hiddemann, W.; Kneba, M.; Kluin-Nelemans, H. 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, 3215-3223

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 lymphoma. *Blood*, 107, 2271-2278

Pott, C.; Tiemann, M.; Linke, B.; Ott, M. M.; von Hofen, M.; Bolz, I.; Hiddemann, W.; Parwaresch, R.; Kneba, M. (1998): Structure of Bcl-1 and IgH-CDR3 rearrangements as clonal markers in mantle cell lymphomas. *Leukemia*, 12, 1630-1637

- Puig, N.; Sarasquete, M. E.; Alcoceba, M.; Balanzategui, A.; Chillón, M. C.; Sebastián, E.; Díaz, M. G.; San Miguel, J. F.; García-Sanz, R. (2012): Kappa deleting element as an alternative molecular target for minimal residual disease assessment by real-time quantitative PCR in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 89, 328-335
- Rimokh, R.; Berger, F.; Delsol, G.; Charrin, C.; Bertheas, M. F.; Ffrench, M.; Garoscio, M.; Felman, P.; Coiffier, B.; Bryon, P. A. (1993): Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. *Blood*, 81, 3063-3067
- Rimokh, R.; Berger, F.; Delsol, G.; Digonnet, I.; Rouault, J. P.; Tigaud, J. D.; Gadoux, M.; Coiffier, B.; Bryon, P. A.; Magaud, J. P. (1994): Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*, 83, 1871-1875
- Robak, T.; Smolewski, P.; Robak, P.; Dreyling, M. (2019): Mantle cell lymphoma: therapeutic options in transplant-ineligible patients. *Leuk Lymphoma*, 60, 2622-2634
- Rosenberg, C. L.; Wong, E.; Petty, E. M.; Bale, A. E.; Tsujimoto, Y.; Harris, N. L.; Arnold, A. (1991): PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 9638-9642
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467
- Siebert, R.; Matthiesen, P.; Harder, S.; Zhang, Y.; Borowski, A.; Zuhlke-Jenisch, R.; Plendl, H.; Metzke, S.; Joos, S.; Zucca, E.; Weber-Matthiesen, K.; Roggero, E.; Grote, W.; Schlegelberger, B. (1998): Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol*, 9, 519-526
- Stolz, F.; Panzer, S.; Panzer-Grumayer, E. R. (1999): Multiplex PCR reaction for the detection and identification of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B-lineage leukaemias. *Br J Haematol*, 106, 486-490
- Swerdlow, S. H.; Habeshaw, J. A.; Murray, L. J.; Dhaliwal, H. S.; Lister, T. A.; Stansfeld, A. G. (1983): Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *Am J Pathol*, 113, 181-197
- Swerdlow, S. H.; Williams, M. E. (2002): From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol*, 33, 7-20

Tam, C. S.; Anderson, M. A.; Pott, C.; Agarwal, R.; Handunnetti, S.; Hicks, R. J.; Burbury, K.; Turner, G.; Di Iulio, J.; Bressel, M.; Westerman, D.; Lade, S.; Dreyling, M.; Dawson, S.-J.; Dawson, M. A.; Seymour, J. F.; Roberts, A. W. (2018): Ibrutinib plus venetoclax for the treatment of mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 378, 1211-1223

Tonegawa, S. (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302, 575-581

van den Berghe, H.; Parloir, C.; David, G.; Michaux, J. L.; Sokal, G. (1979): A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders. *Cancer*, 44, 188-195

van der Burg, M.; Tumkaya, T.; Boerma, M.; de Bruin-Versteeg, S.; Langerak, A. W.; van Dongen, J. J. (2001): Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood*, 97, 1001-1008

van der Velden, V. H. J.; Cazzaniga, G.; Schrauder, A.; Hancock, J.; Bader, P.; Panzer-Grumayer, E. R.; Flohr, T.; Sutton, R.; Cave, H.; Madsen, H. O.; Cayuela, J. M.; Trka, J.; Eckert, C.; Foroni, L.; zur Stadt, U.; Beldjord, K.; Raff, T.; van der Schoot, C. E.; van Dongen, J. J. (2007): Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21, 604-611

van der Velden, V. H. J.; de Bie, M.; van Wering, E.; van Dongen, J. (2006): Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease. *Haematologica*, 91, 679-682

van der Velden, V. H. J.; Willemse, M. J.; van der Schoot, C. E.; Hahlen, K.; van Wering, E. R.; van Dongen, J. J. (2002): Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*, 16, 928-936

van Dongen, J. J.; Langerak, A. W.; Brüggemann, M.; Evans, P. A.; Hummel, M.; Lavender, F. L.; Delabesse, E.; Davi, F.; Schuurin, E.; Garcia-Sanz, R.; van Krieken, J. H.; 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 recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*, 17, 2257-2317

van Dongen, J. J.; van der Velden, V. H. J.; Brüggemann, M.; Orfao, A. (2015): Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*, 125, 3996-4009

van Dongen, J. J.; Wolvers-Tettero, I. L. (1991): Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta*, 198, 1-91

Verhagen, O. J.; Willemse, M. J.; Breunis, W. B.; Wijkhuijs, A. J.; Jacobs, D. C.; Joosten, S. A.; van Wering, E. R.; van Dongen, J. J.; van der Schoot, C. E. (2000): Application of germline IGH probes in real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14, 1426-1435

Victor, K. D.; Vu, K.; Feeney, A. J. (1994): Limited junctional diversity in kappa light chains. Junctional sequences from CD43+B220+ early B cell progenitors resemble those from peripheral B cells. *J Immunol*, 152, 3467-3475

Weichhold, G. M.; Ohnheiser, R.; Zachau, H. G. (1993): The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics*, 16, 503-511

Williams, M. E.; Innes, D. J. J.; Borowitz, M. J.; Lovell, M. A.; Swerdlow, S. H.; Hurtubise, P. E.; Brynes, R. K.; Chan, W. C.; Byrne, G. E. J.; Whitcomb, C. C. (1987): Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in human lymphoma and leukemia. *Blood*, 69, 79-86

Williams, M. E.; Swerdlow, S. H.; Meeker, T. C. (1993): Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia*, 7, 1437-1440

Withers, D. A.; Harvey, R. C.; Faust, J. B.; Melnyk, O.; Carey, K.; Meeker, T. C. (1991): Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol*, 11, 4846-4853

Yatabe, Y.; Suzuki, R.; Tobinai, K.; Matsuno, Y.; Ichinohasama, R.; Okamoto, M.; Yamaguchi, M.; Tamaru, J.; Uike, N.; Hashimoto, Y.; Morishima, Y.; Suchi, T.; Seto, M.; Nakamura, S. (2000): Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95, 2253-2261

7. Anhänge

7.1 Auflistung der in dieser Arbeit erhaltenen Igκ-Jκ-Sequenzen

Tabelle A: Auflistung der Igκ-Jκ-Sequenzen (Del - Deletion, Ins - **Insertion**, Mut - *Mutation*, Vκ - Variable-Genregion der Immunglobulinleichte Kette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichte Kette kappa)
 Aufgelistet sind pro Patient das identifizierte Gen von Vκ und Jκ (Vκ- bzw. Jκ-Gen), die identifizierten Gensequenzen von Vκ und Jκ (Vκ- bzw. Jκ-Gensequenz) die Anzahl an mutierten bzw. deletierten Basen in diesen Gensequenzen (Mut bzw. Del) und die Sequenz der N-Region (N-Sequenz).

| Patient | Vκ-Gen | Jκ-Gen | Mut | Vκ-Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | Jκ-Gensequenz | Mut |
|---------|--------|--------|-----|--|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL8 | Vκ1-39 | Jκ5 | 0 | TTCACCTCTACCA TCAGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTTT GCAACTTACTACT GTCAACAGAGTTA CAGTACCCC | -3 | C | 0 | GATCACCTTC GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGT AAG | 0 |
| MCL10 | Vκ4-1 | Jκ4 | 0 | CCTGCAGGCTGAA GATGTGGCAGTTT ATTACTGTCAGCA ATATTATAGTACT CC | -3 | C | 0 | GCTCACTTTC GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AA | 0 |
| MCL11a | Vκ3-20 | Jκ5 | 0 | ACAGGTTCACTGG CAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACCT TCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAA GATTTTGCAGTGT ATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCA CCTC | -1 | - | -2 | TCACCTTCGG CCAAGGGACA CGACTGGAGA TTAAACGTAA GA | 0 |
| MCL11b | Vκ1-39 | Jκ4 | 1 | <u>C</u> TGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAA CTTACTACTGTCA ACAGAGTTACAGT ACCCC | -3 | - | 0 | GCTCACTTTC GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 0 |
| MCL13 | Vκ3-11 | Jκ5 | 0 | TGGCATCCCAGCC AGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGAC AGACTTCACTCTC ACCATCAGCAGCC TAGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTTTAT TACTGTCAGCAGC GTAGCAACTGGCC TCC | 0 | - | 0 | GATCACCTTC GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGT AAG | 0 |
| MCL14 | Vκ3-20 | Jκ1 | 0 | GCATCCCAGACAG GTTCACTGGCAGT GGGTCTGGGACAG ACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTG GAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTA CTGTCAGCAGTAT GGTAGCTCACC | -3 | - | 0 | GTGGACGTTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA <u>G</u> ATCAAACGT AAGACG | 1 |

| Patient | V κ -Gen | J κ -Gen | Mut | V κ -Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | J κ -Gensequenz | Mut |
|---------|------------------|-----------------|-----|---|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL15a | V κ 1-12 | J κ 1 | 5 | CAGCCTACAGCCT GCAGaTTTTGCAA CTTA TC ATTGTCA ACAGGGTAACAGT TTCCCTC | -1 | GC | -8 | TCGGCCAAGG GACCAAGGTG GAGATCAAAC GTAAAG | 1 |
| MCL15b | V κ 2-28 | J κ 4 | 1 | ACAACTATTTGGA TTGGTACCTGCAG AAGCCAGGGCAGT CTCCACAGCTCCT GATCTATTTGGGT TCTAATCGGGCCT CCGGGGTCCCTGA CAGGTTCAAGTGGC AGTGGATCAGGCA CAGATTTTACACT GAAAATTAGCAGA GTGGAGGCTGAGG ATGTTGGGGTTTA TTACTGCATGCAA GCTCTACAAACTC CTC | -1 | G | -3 | CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGTAAG | 0 |
| MCL17a | V κ 1-37 | J κ 5 | 0 | CTCTCACTATCAG CAGCCTGCAGCCT GAAGATGTTGCAA CTTATTACGGTCA ACGGACTTACAAT GCCCC | -3 | CCCCT | -6 | CTTCGGCCAA GGGACACGAC TGGAGATTAA ACGTAA | 0 |
| MCL17b | V κ 2D-29 | J κ 1 | 0 | CCTATTTGTATTG GTACCTGCAGAAG CCAGGCCAGCCTC CACAGCTCCTGAT CTATGAAGTTTCC AACCGGTTCTCTG GAGTGCCAGATAG GTTCAAGTGGCAGC GGGTCAGGGACAG ATTTCACTGAA AATCAGCCGGGTG GAGGCTGAGGATG TTGGGGTTTATTA CTGCATGCAAAGT ATACAGCTTCCT | -2 | - | -2 | GGACGTTCCG CCAAGGGACC AAGGTGGAGA TCAAACGTAA G | 1 |
| MCL18 | V κ 4-1 | J κ 2 | 2 | CTCCAACAATAAG AACTACTTAGCTT GGTACCAGCAGAA ACCAGGACAGCCT CCTGAGCTGCTCA TTTACTGGGCATC TACCCGGGAATCC GGGGTCCCTGA TC GATTCAGTGGCAG CGGGTCTGGGACA GATTTCACTCTCA CCATCAGCAGCCT GCAGGCTGAAGAT GTGGCAGTTTATT A TT GTGTCAGCAATA TTATAGTACTCCT | -2 | - | -2 | TAACTTTTGG GCCAGGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 1 |

| Patient | Vκ-Gen | Jκ-Gen | Mut | Vκ-Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | Jκ-Gensequenz | Mut |
|---------|---------|--------|-----|--|-----|----------------------|-----|--|-----|
| MCL19 | Vκ3-15 | Jκ2 | 2 | GGTTCAGTGGCAG TGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTCA CCATCAGCGGCCT GCAATCTGAAGAT TTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAGTA TAATAACTGGCCT CC | 0 | – | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 1 |
| MCL20 | Vκ1-37 | Jκ2 | 0 | CAGCCTGCAGCCT GAAGATGTTGCAA CTTATTACGGTCA ACGGACTTACAAT GCCCC | -3 | C | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 1 |
| MCL21 | Vκ1D-43 | Jκ4 | 0 | GCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTC AACAGTATTATAG TACCCCTC | -1 | AGAAGG | -4 | ACTTTCGGCG GAGGGACCAA GGTGGAGATC AAACGTAAGA | 0 |
| MCL23 | Vκ1-33 | Jκ2 | 2 | TCAAGGTTTCAGCG GCAGTGGATCTGG GACAGATTTTACT TTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGA AGATATTGCAACA TATTACTGTCAAC AGTATGATAATCT CCCT | -2 | ACAATGGG CCGTGGAG | -1 | GTACAGTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGAATTTT TCCACTGAT | 1 |
| MCL27 | Vκ1-5 | Jκ1 | 1 | CAGCAGCCTGCAG CCTGATGATTTTG CAACTTATTACTG CCAACAATATAAT AGTTATTCT | -2 | G | -2 | GGACGTTTCGG CCAAGGGACC AAGGTGGAGA TCAAACGTAA G | 1 |
| MCL33 | Vκ1-5 | Jκ2 | 3 | CTGCCTGCAGCCT GATGATTTTGCAA CTTATTACTGCCA ACAATATAATACT TATTC | -3 | – | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL35 | Vκ1-39 | Jκ2 | 0 | CAGCAGTCTGCAA CCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTG TCAACAGAGTTAC AGTACCCCTCC | 0 | TA | -5 | ACTTTTGGCC AGGGGACCAA GGTGGAGATC AAACGTAAGA | 1 |
| MCL36 | Vκ4-1 | Jκ4 | 0 | AGAAACCAGGACA GcCTCCTAAGCTG CTCATTTACTGGG CATCTACCCGGGA ATCCGGGGTCCCT GACCGATTCACTG GCAGCGGGTCTGG GACAGATTTCACT CTCACCATCAGCA GCCTGCAGGCTGA AGATGTGGCAGTT TATTACTGTCAGC AATATTATAGTAC TCC | -3 | C | -1 | CTCACTTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 0 |

| Patient | Vκ-Gen | Jκ-Gen | Mut | Vκ-Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | Jκ-Gensequenz | Mut |
|---------|--------|--------|-----|---|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL40 | Vκ3-15 | Jκ4 | 2 | TATCCCAGCCAAT TTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGA GTTCACTCTCACC ATCAGCAGCCTGC AGTCTGAAGATTT TGCAGTTTATTAC TGTCAGCAGTATA ATAACTGGCCT | -2 | - | -1 | CTCACTTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 0 |
| MCL43 | Vκ1-39 | Jκ1 | 0 | CAGCAGTCTGCAA CCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTG TCAACAGAGTTAC AGTACCCCTC | -1 | - | 0 | GTGGACGTTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 0 |
| MCL44 | Vκ1-5 | Jκ2 | 2 | AGCAGCCTGC <u>TGC</u> CTGATGATTTTGC AACTTATTACTGC CAACA <u>CT</u> TATAATA GTTAT | -5 | C | 0 | TGTACACTTTT TGGCCAGGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG TAAG | 1 |
| MCL45 | Vκ2-30 | Jκ3 | 1 | CACCTACTTGAAT TGGTTTCAGCAGA <u>AGCC</u> AGGCCAATC TCCAAGGCGCCTA ATTTATAAGGTTT CTAACCGGGACTC TGGGGTCCCAGAC AGATTCAAGCGGCA GTGGGTCAGGCAC TGATTTCACTG AAAATCAGCAGGG TGGAGGCTGAGGA TGTTGGGGTTTAT TACTGCATGCAAG GTACACACTG | -6 | AATAG | -2 | TCACTTTCGG CCCTGGGACC AAGGTGGAG <u>A</u> TCAAACGTAA G | 2 |
| MCL48 | Vκ1-37 | Jκ2 | 0 | CAGCCTGCAGCCT GAAGATGTTGCAA CTTATTACGGTCA ACGGACTTACAAT GCCCCTCC | 0 | - | -1 | GTGCAGTTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 1 |
| MCL52 | Vκ1-17 | Jκ1 | 0 | GCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTC TACAGCATAATAG TTACCC | -3 | - | 0 | GTGGACGTTTC GGCCAAGGGGA CCAAGGTGGA <u>GAT</u> CAAACGT AAGA | 1 |
| MCL55 | Vκ1-16 | Jκ2 | 0 | CTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCA ACAGTATAATAGT TACCC | -3 | - | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL56 | Vκ1-39 | Jκ4 | 1 | AGCAGTCTGCAAC CTGAAGATTTTGC AACTTACTACTGT CAACAGAGTTACA CTACCCC | -3 | C | -1 | CTCACTTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 0 |
| MCL58 | Vκ1-16 | Jκ4 | 0 | CAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGCAA CTTATTACTGCCA ACAGTATAATAGT TACC | -4 | - | -1 | CTCACTTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 0 |

| Patient | V κ -Gen | J κ -Gen | Mut | V κ -Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | J κ -Gensequenz | Mut |
|---------|-----------------|-----------------|-----|---|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL60 | V κ 4-1 | J κ 4 | 0 | CTACTTAGCTTGG TACCAGCAGAAAC CAGGACAGCCTCC TAAGCTGCTCATT TCCTGGGCATCTA CCCGGGAATCCGG GGTCCCTGACCGA TTCAGTGGCAGCG GGTCTGGGACAGA TTTCACTCTCANC ATCAGCAGCCTGC AGGCTGAAGATGT GGCAGTTTATTAC TGTCAGCAATATT ATAGTA | -7 | TTCC | 0 | GCTCACTTTC GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 0 |
| MCL61 | V κ 2-28 | J κ 5 | 0 | TAGTAATGGATAC AACTATTTGGATT GGTACCTGCAGAA GCCAGGGCAGTCT CCACAGCTCCTGA TCTATTTGGGTTT TAATCGGGCCTCC GGGGTCCCTGACA GGTTCAGTGGCAG TGGATCAGGCACA GATTTTACACTGA AAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGAT GTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGC TCTACAAA | -7 | - | -6 | CTTCGGCCAA GGGACACGAC TGGAGATTAA ACGTAAGA | 0 |
| MCL62 | V κ 1-39 | J κ 2 | 1 | AGTAGTCTGCAAC CTGAAGATTTTGC AACTTACTACTGT CAACAGAGTTACA GTACCC | -4 | TCGC | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL64 | V κ 3-20 | J κ 1 | 3 | CAGGTTCAAGTGGC AGTGGGTCTGGGA CAGACTTCACTCT CACCATCAGCGGA CTGGAGACTGAAG ATTTTGCAAGTGTA CTACTGTCAGCAG TATGGTAGCTCAC C | -3 | - | 0 | GTGGACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 1 |

| Patient | V κ -Gen | J κ -Gen | Mut | V κ -Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | J κ -Gensequenz | Mut |
|---------|-----------------|-----------------|-----|--|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL68 | V κ 2-30 | J κ 1 | 7 | AAACCTACTTGA CTGGTTTCAGCAG AGGCCAGGCCAAT CTCCAAGGCGCCT AATTTATAAGCTT TCTAA TC GGGACT CTGGGGTCCCAGA CAGATTCAGCGGC AGTGGGTCAGGCA CTGATTTACACT GAAGATCAGCAGA GTGGAGGCTGAGG ATGTTGGGATTTA TTACTGCATGCAA GGTACACACTGGC CTCC | 0 | AC | 0 | GTGGACGTTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAG | 1 |
| MCL70 | V κ 1-39 | J κ 2 | 0 | TTCACTCTCACCA TCAGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTTT GCAACTTACTACT GTCAACAGAGTTA CAGTACCCC | -3 | - | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL71 | V κ 1-12 | J κ 4 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTG CAACTTACTATTG TCAACAGGCTAAC AGTTTCCCT | -2 | - | -1 | CTCACTTTTCG GCGGAGGGAC CAAGGTGGAG ATCAAACGTA AGA | 0 |
| MCL77 | V κ 4-1 | J κ 2 | 0 | ACTTAGCTTGGTA CCAGCAGAAACCA GGACAGCCTCCTA AGCTGCTCATTTA CTGGGCATCTACC CGGGAATCCGGGG TCCCTGACCGATT CAGTGGCAGCGGG TCTGGGACAGATT TCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAG GCTGAAGATGTGG CAGTTTATTACTG TCAGCAATATTAT AGTACTCC | -3 | - | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL79a | V κ 1-9 | J κ 5 | 1 | ATTCACTCTCAC ATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTT TGCAACTTATTAC TGTC AACAGCTTA ATAGTTACCCTCC | 0 | - | -1 | ATCACCTTCG GCCAAGGGAC ACGACTGGAG ATTAAACGTA AGA | 0 |
| MCL79b | V κ 3-20 | J κ 4 | 0 | CCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCA GCAGACTGGAGCC TGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTC AGCAGTATGGTAG CTCACC | -3 | GGG | -3 | CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGTAAG A | 0 |

| Patient | Vκ-Gen | Jκ-Gen | Mut | Vκ-Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | Jκ-Gensequenz | Mut |
|---------|--------|--------|-----|---|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL81 | Vκ1-39 | Jκ2 | 1 | CAGCAGTCTGCAA CCTGAAGATTTTG CAACTTACTACTG TCAACAGAGTTAC AGTAC TCC | -3 | - | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL82 | Vκ1-17 | Jκ2 | 0 | GCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTC TACAGCATAATAG TTACCCTC | -1 | - | -1 | GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGGTGGA GATCAAACGT AAGA | 1 |
| MCL83 | Vκ3-20 | Jκ5 | 0 | ACAGGTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAA GATTTTGCAGTGT ATTACTGTCAGCA GTATGGTAGCTCA C | -4 | TCGAGG | 0 | GATCACCTTC GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGT AAGA | 0 |
| MCL85 | Vκ1-16 | Jκ5 | 1 | TCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTG CCAACAGTATAAT AGCTA | -6 | AG | 0 | GATCACCTTC GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAAACGT AAGA | 0 |

7.2 Auflistung der in dieser Arbeit erhaltenen Igκ-KDE-Sequenzen

Tabelle B: Auflistung der Igκ-KDE-Sequenzen (Del - Deletion, Ins - **Insertion**, Mut - *Mutation*, Vκ - Variable-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element)
 Aufgelistet sind pro Patient das identifizierte Gen von Vκ bzw. Intron/RSS (Vκ-Gen bzw. Intron/RSS), die identifizierten Gensequenzen von Vκ bzw. Intron/RSS und KDE (Vκ- bzw. Intron/RSS- und KDE-Gensequenz) die Anzahl an mutierten bzw. deletierten Basen in diesen Gensequenzen (Mut bzw. Del) und die Sequenz der N-Region (N-Sequenz).

| Patient | Vκ- Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | Vκ- bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|-------------------------------|-----|-----|---|-----|---------------|-----|--|-----|
| MCL5 | Vκ1-27 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATGTTG CAACTTATTACTG TCAAAAGTATAAC AGTGCCC | -4 | TT | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCTCCCTGCTCCC TAGGACAACCTGC TCTGACCTCTGAG G | 0 |
| MCL6 | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCC | -5 | CGAGGGAG G | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC TCCCTAGGAAGC | 0 |
| MCL8a | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCTTGAT | -1 | – | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC T | 0 |
| MCL8b | Intron/RSS | 0 | 1 | CTTTGGTGGCCAT GCCACCGCGCTCT TGGGGCAGCCGCC TTGCC <u>A</u> CTAGTGG CCGTGGCCACCCT GTGTCTGCCCGAT TGATGCTGCCGTA GCCAGCTTTCTCTG AT | -1 | A | -8 | AGTGGCAGCCCAG GGCGACTCCTCAT GAGTCTGCAGCTG CATTTTTGCCATA TCCACTATTTGGA GTCTGACCTCCCT AGGAAGCCTCCCT GCTCCCTAGGACA ACCTGCTCTGACC TCTGAGG | 0 |

| Patient | V α - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V α - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|--|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL9 | V α 3-11 | 0 | 0 | CCAGGTTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAG CCTAGAGCCTGAA GATTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCA GCGTAGCAACTGG CCT | -2 | T | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCTCCCTGCTCCC TAGGACAACCTGC TCTGACCTCTGAG G | 0 |
| MCL10 | V α 1-17 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTG TCTACAGCATAAT AGTTACCC | -3 | CC | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCTCCCTGCTCCC TAGGACAACCTGC TCTGACCTCTGAG G | 0 |
| MCL12 | V α 1-39 | 0 | 0 | TTCACCTCTACCA TCAGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTTT GCAACTTACTACT GTCAACAGAGTTA CAGTACCC | -4 | TAAA | -5 | CCTAGTGGCAGCC CAGGGCGACTCCT CATGAGTCTGCAG CTGCATTTTGGCC ATATCCACTATTT GGAGTCTGACCTC CCTAGGAAGCCTC CCTG | 0 |
| MCL16a | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTA ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT G | 0 | G | -6 | CTAGTGGCAGCCC AGGGCGACTCCTC ATGAGTCTGCAGC TGCAATTTTGCCA TATCCACTATTTG GAGTCTGACCTCC CTAGGAAGC | 0 |
| MCL16b | V α 3D-20 | 0 | 0 | CCCAGGCTCCTCA TCTATGATGCATC CAGCAGGGCCACT GGCATCCCAGACA GGTTCAGTGGCAG TGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCA CCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGAT TTTGCAGTGTATT ACTGTCAGCAGTA TGGTAGCTCACCT | -2 | G | -9 | GTGGCAGCCCAGG GCGACTCCTCATG AGTCTGCAGCTGC ATTTTGGCCATAT CCACTATTTGGAG TCTGACCTCCCT AGGAAG | 0 |

| Patient | V κ - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V κ - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|--|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL17a | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGA | -2 | - | -7 | TAGTGGCAGCCCA GGGCGACTCCTCA TGAGTCTGCAGCT GCATTTTTGCCAT ATCCACTATTTGG AGTCTGACCTCC | 0 |
| MCL17b | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGA | -2 | - | -14 | AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCT | 0 |
| MCL23a | V κ 1D-43 | 0 | 0 | GATTTTGCAACTT ATTACTGTCAACA GTATTATAGTACC CCTC | -1 | GGCGATAA | -4 | CCCTAGTGGCAGC CCAGGGCGACTCC TCATGAGTCTGCA GCTGCATTTTTC CATATCCACTATT TGGAGTCTGACCT CCCTAGGAAGCCT CCCTGCTCCCTAG GACAACCTGCTCT GACCTCTGAGG | 0 |
| MCL23b | V κ 2-29 | 0 | 0 | ACCTATTTGTATT GGTACCTGCAGAA GCCAGGCCAGTCT CCACAGCTCCTAA TCTATGAAGTTTC CAGCCGGTTCTCT GGAGTGCCAGATA GGTTCAGTGGCAG CGGGTCAGGGACA GATTTACACTGA AAATCAGCCGGGT GGAGGCTGAGGAT GTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGG TATACAC | -8 | TT | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCC | 0 |

| Patient | V α - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V α - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|---|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL25a | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTG | -3 | CCC | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG C | 0 |
| MCL25b | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT | -1 | - | -9 | GTGGCAGCCCAGG GCGACTCCTCATG AGTCTGCAGCTGC ATTTTGGCCATAT CCACTATTGGAG TCTGACCTCCCTA GGAAGC | 0 |
| MCL28a | V α 2-28 | 0 | 0 | TGGATACAACATAT TTGGATTGGTACC TGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAG CTCCTGATCTATT TGGGTTCTAATCG GGCCTCCGGGGTC CCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATC AGGCACAGATTTT ACACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGC TGAGGATGTTGGG GTTTATTACTGCA TGCAAGCTCTACA AACTCCTCC | 0 | GAA | -4 | CCCTAGTGGCAGC CCAGGGCGACTCC TCATGAGTCTGCA GCTGCATTTTTC CATATCCACTATT TGGAGTCTGACCT CCCTAGGAAGCCT CCCTGCTCCCTAG GACAACCTGCTCT GACCTCTGAGG | 0 |
| MCL28b | V α 3-11 | 0 | 0 | TCCCAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGG TCTGGGACAGACT TCACTCTCACCAT CAGCAGCCTAGAG CCTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTG TCAGCAGCGTAGC AACTGGCCTCC | 0 | - | 0 | GGAGCCCTAGTGG CAGCCCAGGGCGA CTCCTCATGAGTC TGCAGCTGCATTT TTGCCATATCCAC TATTTGGAGTCTG ACCTCCCTAGGAA GCCTCCCTGCTCC CTAGGACAACCTG CTCTGACCTCTGA GG | 0 |

| Patient | V κ - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V κ - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|---|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL34a | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACC GCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCC GATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCT | -4 | C | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCT | 0 |
| MCL34b | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACC GCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCC GATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT | -1 | C | -2 | AGCCCTAGTGGCA GCCCAGGGCGACT CCTCATGAGTCTG CAGCTGCATTTT GCCATATCCACTA TTTGGAGTCTGAC CTCCCTAGGAAGC | 0 |
| MCL35 | V κ 1-27 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATGTTG CAACTTATTACTG TCAAAAGTATAAC AGTGCCCCCTC | -1 | G | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC TCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTGT CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC TCCCTAGGAAGCC TCCCTGCTCCCTA GGACAACCTGCTC TGACCTCTGAGG | 0 |
| MCL36 | V κ 2D-26 | 1 | 1 | TACACCTATTTGT ATTGGTTTCTGCA GAAAGCCAGGCCA GTCTCCACA GCTC CTGATCTATGAAG TTTCCAACCGGTT CTCTGGAGTGCCA GATAGGTT CAGTG GCAGCGGGTCAGG GACAGATTT CACA CTGAAAATCAGCC GGGTGGAGGCTGA GGAT GTTGGAGTT TATTACTGCATGC AAGATGCACAAGA TC | -4 | TT | -5 | CCTAGTGGCAGCC CAGGGCGACTCCT CATGAGTCTGCAG CTGCATTTTTTGCC ATATCCACTATTT GGAGTCTGACCTC CCTAGGAAGCCTC CCTGCTCCCTAGG ACAACCTGCTCTG ACCTCTGAG | 0 |

| Patient | V κ - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V κ - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|--|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL37 | V κ 2-30 | 0 | 0 | GCCTCGTATACAG TGATGGAAACACC TACTTGAATTGGT TTCAGCAGAGGCC AGGCCAATCTCCA AGGCGCCTAATTT ATAAGGTTTCTAA CCGGGACTCTGGG GTCCCAGACAGAT TCAGCGGCAGTGG GTCAGGCACTGAT TTCACACTGAAAA TCAGCAGGGTGGA GGCTGAGGATGTT GGGGTTTATTACT GCATGCAAGGTAC ACAC | -8 | GAAA | -2 | AGCCCTAGTGGCA GCCCAGGGCGACT CCTCATGAGTCTG CAGCTGCATTTTT GCCATATCCACTA TTTGGAGTCTGAC CTCCCTAGGAAGC CTCCCTGCTCCCT AGGACAACCTGCT CTGACCTCTGAGG | 0 |
| MCL40 | V κ 2-29 | 0 | 0 | GACCTATTTGTAT TGGTACCTGCAGA AGCCAGGCCAGTC TCCACAGCTCCTG ATCTATGAAGTTT CCAGCCGGTTCTC TGGAGTGCCAGAT AGGTTCAGTGGCA GCGGGTCAGGGAC AGATTTACACTG AAAAATCAGCCGGG TGGAGGCTGAGGA TGTTGGGGTTTAT TACTGAATGCAAG GTATACACCTTCC TCC | 0 | GT | -5 | CCTAGTGGCAGCC CAGGGCGACTCCT CATGAGTCTGCAG CTGCATTTTTGCC ATATCCACTATTT GGAGTCTGACCTC CCTAGGAAGCCTC CCTGCTCCCTAGG ACAACCTGCTCTG ACCTCTGAGG | 0 |
| MCL41a | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT G | 0 | GA | -2 | AGCCCTAGTGGCA GCCCAGGGCGACT CCTCATGAGTCTG CAGCTGCATTTTT GCCATATCCACTA TTTGGAGTCTGAC CTCCCTAGG | 0 |
| MCL41b | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTG | -3 | - | -8 | AGTGGCAGCCCAG GGCGACTCCTCAT GAGTCTGCAGCTG CATTTTTGCCATA TCCACTATTTGGA GTCTGACCTCCCT AGGAAGC | 0 |

| Patient | V α - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V α - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|--|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL43 | V α 2D-30 | 0 | 0 | AAACACCTACTTG AATTGGTTTCAGC AGAGGCCAGGCCA ATCTCCAAGGCGC CTAATTTATAAGG TTTCTAACTGGGA CTCTGGGGTCCCA GACAGATTCAGCG GCAGTGGGTCAGG CACTGATTTACACA CTGAAAATCAGCA GGGTGGAGGCTGA GGATGTTGGGGTT TATTACTGCATGC AAGGTACACACTG GCC | -3 | GCCT | -6 | CTAGTGGCAGCCC AGGGCGACTCCTC ATGAGTCTGCAGC TGCATTTTTGCCA TATCCACTATTTG GAGTCTGACCTCC CTAGGAAGCCTCC CTGCTCCCTAGGA CAACCTGCTCTGA CCTCTGAGG | 0 |
| MCL45 | V α 2D-26 | 2 | 1 | ACACCTATTTGTA TTGGTTTCTGCAG AAAGCCAGGCCAG TCTCCACAGTCTC CTGATCTATGAAG TTTCCAACCGGTT CTCTGGAGTGCCA GATAGGTTCACTG GCAGCGGGTCAGG GACAGATTTACACA CTGAAAATCAGCC GGGTGGAGGCTGA GGATGTTGGAGTT TATTACTGCATGC AAGATGCACAAGA TCCT | -2 | GA | -4 | CCCTAGTGGCAGC CCAGGGCGACTCC TCATGAGTCTGCA GCTGCATTTTTGC CATATCCACTATT TGGAGTCTGACCT CCCTAGGAAGCCT CCCTGCTCCCTAG G | 0 |
| MCL46 | V α 1-9 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTG TCAACAGCTTAAT AGTTACCC | -3 | CCC GGG | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC TCCCTAGGAAGCC TCCCTGCTCCCTA GGACAACCTGCTC TGACCTCTGAGG | 0 |
| MCL50 | V α 2-30 | 0 | 0 | GGAAACACCTACT TGAATTGGTTTCA GCAGAGGCCAGGC CAATCTCCAAGGC GCCTAATTTATAA GGTTTCTAACCGG GACTCTGGGGTCC CAGACAGATTCAG CGGCAGTGGGTCA GGCACTGATTTCA CACTGAAAATCAG CAGGGTGGAGGCT GAGGATGTTGGGG TTTATTACTGCAT GCAAG | -16 | - | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC TCCCTAGGAAGCC TCCCTGCTCCCTA GGACAACCTGCTC TGACCTCTGAGG | 0 |

| Patient | Vx- Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | Vx- bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|-------------------------------|-----|-----|--|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL53 | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT G | 0 | CAT | -2 | AGCCCTAGTGGCA GCCCAGGGCGACT CCTCATGAGTCTG CAGCTGCATTTTT GCCATATCCACTA TTTGGAGTCTGAC CTCCCT | 0 |
| MCL54 | Intron/RSS | 0 | 1 | GGTCTTTCTCGAT TGAGTGGCTTTGG TGGCCATGCCACC GCGCTCTTGGGGC AGCCGCCTTGCCG CTAGTGGCCGTGG CCACCCTGTGTCT GCCCATT <u>A</u> ATGC TGCCGTAGCCAGC TTTCCTG | -3 | - | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGTCTGC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGT | 0 |
| MCL58 | Vx1-17 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTG TCTACAGCATAAT AGTTACCCT | -2 | - | -5 | CCTAGTGGCAGCC CAGGGCGACTCCT CATGAGTCTGCAG CTGCATTTTTGCC ATATCCACTATTT GGAGTCTGACCTC CCTAGGAAGCCTC CCTGCTCCCTAGG ACAACCTGCTCTG ACCTCTGAGG | 0 |
| MCL59a | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTGAT | -1 | - | -4 | CCCTAGTGGCAGC CCAGGGCGACTCC TCATGAGTCTGCA GCTGCATTTTTGC CATATCCACTATT TGGAGTCTGACCT CCCT | 0 |
| MCL59b | Vx1-12 | 0 | 0 | CAAGGTTCAGCGG CAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAA GATTTTGCAACTT ACTATTGTCAACA GGCTAACAGTTTC CCTCC | 0 | GGA | -10 | TGGCAGCCCAGGG CGACTCCTCATGA GTCTGCAGCTGCA TTTTTGCCATATC CACTATTTGGAGT CTGACCTCCCT | 0 |

| Patient | V α - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V α - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|--|-----|-----------|-----|--|-----|
| MCL60 | V α 1-27 | 0 | 0 | CAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATGTTG CAACTTATTACTG TCAAAAGTATAAC AGTGCCC | -4 | – | -7 | TAGTGGCAGCCCA GGGCGACTCCTCA TGAGTCTGCAGCT GCATTTTTGCCAT ATCCACTATTTGG AGTCTGACCTCCC TAGGAAGCCTCCC TGCTCCCTAGGAC AACCTGCTCTGAC CTCTGAGG | 0 |
| MCL61 | V α 3-11 | 0 | 0 | CCAGGTTCACTGG CAGTGGGTCTGGG ACAGACTTCACTC TCACCATCAGCAG CCTAGAGCCTGAA GATTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCA GCGTAGCAACTGG CC | -3 | C | 0 | GGAGCCCTAGTGG CAGCCCAGGGCGA CTCCTCATGAGTC TGCAGCTGCATTT TTGCCATATCCAC TATTTGGAGTCTG ACCTCCCTAGGAA GCCTCCCTGCTCC CTAGGACAACCTG CTCTGACCTCTGA GG | 0 |
| MCL62 | V α 4-1 | 0 | 0 | TACAGCTCCAACA ATAAGAATACTT AGCTTGGTACCAG CAGAAACCAGGAC AGCCTCCTAAGCT GCTCATTTACTGG GCATCTACCCGGG AATCCGGGGTCCC TGACCGATTCACT GGCAGCGGGTCTG GGACAGATTTTAC TCTCACCATCAGC AGCCTGCAGGCTG AAGATGTGGCAGT TTATTACTGTCAG CAATATTATAGTA CTCCT | -2 | T | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCTCCCTGCTCCC TAGGACAACCTGC TCTGACCTCTGAG G | 0 |
| MCL66a | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGCAGCCGCCTT GCC <u>A</u> CTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCCGATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTG | -3 | TT | -2 | AGCCCTAGTGGCA GCCCAGGGCGACT CCTCATGAGTCTG CAGCTGCATTTTT GCCATATCCACTA TTTGGAGTCTGAC CTCCCT | 0 |
| MCL66b | Intron/RSS | 0 | 1 | TTTGGTGGCCATG CCACCGCGCTCTT GGGGCAGCCGCCT TGCCGCTAGTGGC CGTGGCCACCTG TGTCTGCCCCGATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAG CCAGCTTTC | -6 | ACC | -8 | AGTGGCAGCCCAG GGCGACTCCTCAT GAGTCTGCAGCTG CATTTTTGCCATA TCCACTATTTGGA GTCTGACCTCCCT | 0 |

| Patient | V κ - Gen bzw. Intron/RSS | Ins | Mut | V κ - bzw. Intron/RSS- Gensequenz | Del | N-Sequenz | Del | KDE-Gensequenz | Mut |
|---------|--|-----|-----|---|-----|-----------|-----|---|-----|
| MCL71 | Intron/RSS | 0 | 0 | CAGCCGCCTTGCC GCTAGTGGCCGTG GCCACCCTGTGTC TGCCCGATTGATG CTGCCGTAGCCAG CTTTCCTGATG | 0 | – | -9 | GTGGCAGCCCAGG GCGACTCCTCATG AGTCTGCAGCTGC ATTTTTGCCATAT CCACTATTTGGAG TCTGACCTCCCTA GGAAGCCT | 0 |
| MCL75 | Intron/RSS | 0 | 1 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATT <u>A</u> ATGCTGCCGTAGC CAGCTTTCCTG | -3 | – | -3 | GCCCTAGTGGCAG CCCAGGGCGACTC CTCATGAGCTGTC AGCTGCATTTTTG CCATATCCACTAT TTGGAGTCTGACC TCCCT | 0 |
| MCL80 | V κ 7-3 | 0 | 0 | GACCGATTTCAAC CTCACAATTAATC CTGTGGAAGCTAA TGATACTGCAAAT TATTACTGTCTGC AGAGTAAGAATTT | -3 | CCC | -1 | GAGCCCTAGTGGC AGCCCAGGGCGAC TCCTCATGAGTCT GCAGCTGCATTTT TGCCATATCCACT ATTTGGAGTCTGA CCTCCCTAGGAAG CCTCCCTGCTCCC TAGGACAACCTGC TCTGACCT | 0 |
| MCL85 | Intron/RSS | 0 | 0 | CGTGGCACCGCGA GCTGTAGACAGAG CCGCGGTCTTTCT CGATTGAGTGGCT TTGGTGGCCATGC CACCGCGCTCTTG GGGCAGCCGCCTT GCCGCTAGTGGCC GTGGCCACCCTGT GTCTGCCCATTG ATGCTGCCGTAGC CAGCTTT | -7 | CTT | 0 | GGAGCCCTAGTGG CAGCCCAGGGCGA CTCCTCATGAGTC TGCAGCTGCATTT TTGCCATATCCAC TATTTGGAGTCTG ACCTCCCT | 0 |

7.3 Sequenzen der in dieser Arbeit erstellten Primer

Tabelle C: Sequenzen der patientenspezifischen Primer für Ig κ -J κ . Dargestellt sind das identifizierte V κ - und J κ -Gen sowie die DNA-Sequenz des Primers (**fett**: Ende der Komplementärsequenz von V κ ; Bindestrich: Ende der N-Region bzw. Beginn der J κ -Komplementärsequenz).

| Patient | V κ -Gen | J κ -Gen | DNA-Sequenz (5' nach 3') |
|---------|------------------|-----------------|--|
| MCL8 | V κ 1-39 | J κ 5 | TGTCAACAGAGTTACAGTACCCCC-GA |
| MCL10 | V κ 4-1 | J κ 4 | ACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCC-GC |
| MCL14 | V κ 3-20 | J κ 1 | TCAGCAGTATGGTAGCTCACC-GT |
| MCL17a | V κ 1-37 | J κ 5 | ACTTACAATGCCCCCCCC-TCT |
| MCL17b | V κ 2D-29 | J κ 1 | CATGCAAAGTATACAGCTTCCT-GG |
| MCL18 | V κ 4-1 | J κ 2 | GTTTATTATTGTGTCAGCAATATTATAGTACTCCT-TA |
| MCL19 | V κ 3-15 | J κ 2 | TCAGCAGTATAATAACTGGCCTCC-GTAC |
| MCL23 | V κ 1-33 | J κ 2 | CTACAATGGGCCGTGGAG-GT |
| MCL27 | V κ 1-5 | J κ 1 | TGCCAACAAATATAATAGTTATTCTG-GGAC |
| MCL35 | V κ 1-39 | J κ 2 | TCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCTA-AC |
| MCL36 | V κ 4-1 | J κ 4 | CTGTCAGCAATATTATAGTACTCCC-CTC |
| MCL40 | V κ 3-15 | J κ 4 | GTCAGCAGTATAATAACTGGCCT-CTC |
| MCL43 | V κ 1-39 | J κ 1 | GTCAACAGAGTTACAGTACCCCTC-G |
| MCL45 | V κ 2-30 | J κ 3 | CAAGGTACACACTGAATAG-TC |
| MCL58 | V κ 1-16 | J κ 4 | ATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACC-CT |
| MCL60 | V κ 4-1 | J κ 4 | TTACTGTCAGCAATATTATAGTATTCC-GC |
| MCL61 | V κ 2-28 | J κ 5 | TTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAA-CT |
| MCL62 | V κ 1-39 | J κ 2 | GAGTTACAGTACCCCTCGC-GTAC |
| MCL71 | V κ 1-12 | J κ 4 | TCAACAGGCTAACAGTTTCCT-CT |
| MCL77 | V κ 4-1 | J κ 2 | TATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCC-GTAC |
| MCL81 | V κ 1-39 | J κ 2 | TACTGTCAACAGAGTTACAGTACTCC-GTAC |
| MCL82 | V κ 1-17 | J κ 2 | ACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCTC-GTAC |
| MCL83 | V κ 3-20 | J κ 5 | CAGTATGGTAGCTCAGTCGAGG-GAT |
| MCL85 | V κ 1-16 | J κ 5 | CAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGCTAAG-G |

Tabelle D: Sequenzen der patientenspezifischen Primer für Ig κ -KDE. Dargestellt sind das identifizierte V κ -Gen bzw. Intron/RSS sowie die DNA-Sequenz des Primers (**fett**: Ende der Komplementärsequenz von V κ bzw. Intron/RSS; Bindestrich: Ende der N-Region bzw. Beginn der KDE-Komplementärsequenz).

| Patient | Genlocus (V κ bzw. Intron/RSS) | DNA-Sequenz (5' nach 3') |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------|
| MCL5 | V κ 1-27 | TGTCAAAAGTATAACAGTGCCCTT-GA |
| MCL6 | Intron/RSS | AGCTTTCCCGAGGGAGG-G |
| MCL8a | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTGAT-G |
| MCL8b | Intron/RSS | CGTAGCCAGCTTTCCTGATA-AG |
| MCL9 | V κ 3-11 | AGCGTAGCAACTGGCCTT-GA |
| MCL10 | V κ 1-17 | GTCTACAGCATAATAGTTACCCCC-GA |
| MCL12 | V κ 1-39 | CAACAGCAGTTACAGTACCCCTAAA-CCTA |
| MCL16a | Intron/RSS | AGCCAGCTTTCCTGATGG-CTA |
| MCL16b | V κ 3D-20 | AGCAGTATGGTAGCTCACCTG-GT |
| MCL17a | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTGA-TA |
| MCL17b | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTGA-AG |
| MCL23a | V κ 1D-43 | ACCCCTCGGCGATAA-CCCTA |
| MCL23b | V κ 2-29 | ATTACTGCATGCAAGGTATACACTT-GA |
| MCL25a | Intron/RSS | CCAGCTTTCCTGCCC-GA |
| MCL25b | Intron/RSS | CGTAGCCAGCTTTCCTGAT-GT |
| MCL28a | V κ 2-28 | AGCTCTACAACTCCTCCGAA-CCCTA |

| Patient | Genlocus (V κ bzw. Intron/RSS) | DNA-Sequenz (5' nach 3') |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| MCL28b | V κ 3-11 | CAACTGGCCTCC-GGAGC |
| MCL34a | Intron/RSS | CGTAGCCAGCTTTCCTGATC-AG |
| MCL34b | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTC-G |
| MCL35 | V κ 1-27 | AGTGCCCTCG-GCCCTA |
| MCL36 | V κ 2D-26 | TGCAAGATGCACAAGATCCTT-CCTA |
| MCL37 | V κ 2-30 | CATGCAAGGTACACACGAAA-AGC |
| MCL40 | V κ 2-29 | AGGTATACACCTTCCCTCCGT-CCTA |
| MCL41a | Intron/RSS | AGCCAGCTTTCCTGATGGA-AG |
| MCL41b | Intron/RSS | GCCGTAGCCAGCTTTCCTG-A |
| MCL43 | V κ 2D-30 | GTACACACTGGCCGCCT-CTAGT |
| MCL45 | V κ 2D-26 | CAAGATGCACAAGATCCTGA-CC |
| MCL46 | V κ 1-9 | ATAGTTACCCCCCGGG-GC |
| MCL50 | V κ 2-30 | GGGGTTTATTACTGCATGCAAG-G |
| MCL53 | Intron/RSS | AGCCAGCTTTCCTGATGCAT-AG |
| MCL54 | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTG-G |
| MCL58 | V κ 1-17 | TACTGTCTACAGCATAATAGTTACCCT-CCT |
| MCL59a | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTGAT-C |
| MCL59b | V κ 1-12 | CTAACAGTTTCCCTCCGGA-TG |
| MCL60 | V κ 1-27 | TTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCC-T |
| MCL61 | V κ 3-11 | CGTAGCAACTGGCCC-GGA |
| MCL62 | V κ 4-1 | TTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACTCCTT-GA |
| MCL66a | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTGTT-AG |
| MCL66b | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCACC-AG |
| MCL71 | Intron/RSS | GTAGCCAGCTTTCCTGATG-GT |
| MCL75 | Intron/RSS | CGTAGCCAGCTTTCCTG-GC |
| MCL80 | V κ 7-3 | GTCTGCAGAGTAAGAATTTCCC-GA |
| MCL85 | Intron/RSS | CCGTAGCCAGCTTTCCTT-GGA |

7.4 Vergleich der Verdünnungsreihentestung zu den Merkmalen der N-Regionen

Tabelle E: Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung der zehn Igκ-Jκ-Patienten (Sensitivität, QR - quantitativer Messbereich, BC - cycle threshold der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (buffy coat), Steigung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient) im Vergleich mit den Charakteristika der zugehörigen N-Region (Länge der N-Region und Deletionen an Vκ und Jκ, jeweils in Basenpaaren)

| Patient | Sensitivität | QR | BC | Steigung der Standardkurve | Korrelationskoeffizient | Deletion an Vκ | Länge der N-Region | Deletion an Jκ |
|---------|--------------|----------|-------|----------------------------|-------------------------|----------------|--------------------|----------------|
| MCL10 | 0,00056 | 0,0056 | 33,32 | -3,55 | 1,00 | -3 | 1 | 0 |
| MCL14 | 0,0031 | 0,0310 | 30,57 | -2,87 | 0,99 | -3 | 0 | 0 |
| MCL23a | 0,00001 | 0,000121 | 45,00 | -3,45 | 1,00 | -2 | 16 | -1 |
| MCL27 | 0,00001 | 0,00021 | 35,38 | -3,67 | 1,00 | -2 | 1 | -2 |
| MCL58 | 0,00055 | 0,0055 | 32,44 | -3,70 | 1,00 | -1 | 0 | -4 |
| MCL62 | 0,00039 | 0,00039 | 37,04 | -3,32 | 0,99 | -4 | 4 | -1 |
| MCL71 | 0,0005 | 0,01 | 33,64 | -3,61 | 1,00 | -2 | 0 | -1 |
| MCL77 | 0,0005 | 0,01 | 32,84 | -4,36 | 0,99 | -3 | 0 | -1 |
| MCL81 | 0,0017 | 0,034 | 32,21 | -3,71 | 0,99 | -3 | 0 | -1 |
| MCL82 | 0,000065 | 0,0013 | 32,58 | -4,58 | 0,99 | -1 | 0 | -1 |

Tabelle F: Ergebnisse der Verdünnungsreihentestung der 30 Igκ-KDE-Patienten (Sensitivität, QR - quantitativer Messbereich, BC - cycle threshold der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (buffy coat), Steigung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient) im Vergleich mit den Charakteristika der zugehörigen N-Region (Länge der N-Region und Deletionen an Vκ bzw. Intron/RSS und KDE, jeweils in Basenpaaren)

| Patient | Sensitivität | QR | BC | Steigung der Standardkurve | Korrelationskoeffizient | Deletion an Vκ bzw. Intron/RSS | Länge der N-Region | Deletion an KDE |
|---------|--------------|----------|-------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------|
| MCL5 | 0,000015 | 0,00015 | 34,79 | -2,83 | 0,99 | -4 | 2 | -1 |
| MCL6 | 0,000022 | 0,000215 | 45,00 | -3,58 | 1,00 | -5 | 9 | -3 |
| MCL8b | 0,0032 | 0,032 | 30,52 | -2,52 | 0,99 | -1 | 1 | -8 |
| MCL9 | 0,000295 | 0,00295 | 35,03 | -3,39 | 1,00 | -2 | 1 | -1 |
| MCL10 | 0,00028 | 0,0028 | 33,74 | -3,49 | 1,00 | -3 | 2 | -1 |
| MCL12 | 0,000011 | 0,00011 | 40,18 | -3,64 | 0,98 | -4 | 4 | -5 |
| MCL16b | 0,0004 | 0,0004 | 34,60 | -3,86 | 1,00 | -2 | 1 | -9 |
| MCL17b | 0,00188 | 0,0188 | 30,58 | -3,91 | 0,99 | -2 | 0 | -14 |
| MCL23a | 0,00001 | 0,000061 | 40,70 | -3,77 | 0,99 | -1 | 8 | -4 |
| MCL25a | 0,00033 | 0,00066 | 33,91 | -3,19 | 0,99 | -3 | 3 | -1 |
| MCL28a | 0,00013 | 0,0025 | 34,01 | -3,51 | 1,00 | 0 | 3 | -4 |
| MCL28b | 0,00025 | 0,0025 | 31,29 | -3,18 | 0,99 | 0 | 0 | 0 |
| MCL34a | 0,005 | 0,1 | 31,22 | -3,19 | 0,99 | -4 | 1 | -1 |
| MCL35 | 0,00045 | 0,0045 | 33,28 | -3,78 | 1,00 | -1 | 1 | -3 |
| MCL36 | 0,00033 | 0,0066 | 34,20 | -3,69 | 1,00 | -4 | 2 | -5 |
| MCL37 | 0,00001 | 0,000012 | 45,00 | -3,58 | 0,99 | -8 | 4 | -2 |
| MCL40 | 0,000084 | 0,00084 | 36,09 | -3,73 | 1,00 | 0 | 2 | -5 |
| MCL41a | 0,00036 | 0,0036 | 33,40 | -3,72 | 0,98 | 0 | 0 | -2 |
| MCL43 | 0,00015 | 0,00076 | 35,11 | -3,92 | 0,98 | -3 | 4 | -6 |
| MCL45 | 0,000074 | 0,00037 | 36,40 | -3,62 | 0,99 | -2 | 2 | -4 |
| MCL46 | 0,000026 | 0,00026 | 45,00 | -3,57 | 0,98 | -3 | 6 | -3 |
| MCL50 | 0,005 | 0,05 | 29,12 | -3,07 | 1,00 | -16 | 0 | -3 |
| MCL53 | 0,000235 | 0,0047 | 33,39 | -4,30 | 1,00 | 0 | 3 | -2 |
| MCL58 | 0,00028 | 0,0028 | 33,16 | -3,65 | 0,98 | -2 | 0 | -5 |
| MCL59b | 0,00001 | 0,0001 | 45,00 | -3,22 | 0,99 | 0 | 3 | -10 |
| MCL60 | 0,00035 | 0,0069 | 30,59 | -3,44 | 1,00 | -4 | 0 | -7 |

| Patient | Sensitivität | QR | BC | Steigung der Standardkurve | Korrelationskoeffizient | Deletion an V α bzw. Intron/RSS | Länge der N-Region | Deletion an KDE |
|---------|--------------|---------|-------|----------------------------|-------------------------|--|--------------------|-----------------|
| MCL61 | 0,000067 | 0,00067 | 35,64 | -3,55 | 1,00 | -3 | 1 | 0 |
| MCL62 | 0,00039 | 0,0039 | 35,43 | -3,50 | 0,99 | -2 | 1 | -1 |
| MCL66b | 0,0006 | 0,006 | 35,20 | -3,70 | 0,98 | -6 | 3 | -8 |
| MCL80 | 0,00001 | 0,0001 | 35,41 | -3,90 | 1,00 | -3 | 3 | -1 |
| MCL85 | 0,0006 | 0,0012 | 36,65 | -4,16 | 0,99 | -7 | 3 | 0 |

7.5 Charakteristika der einzelnen MRD-Targets in der Verdünnungsreihentestung

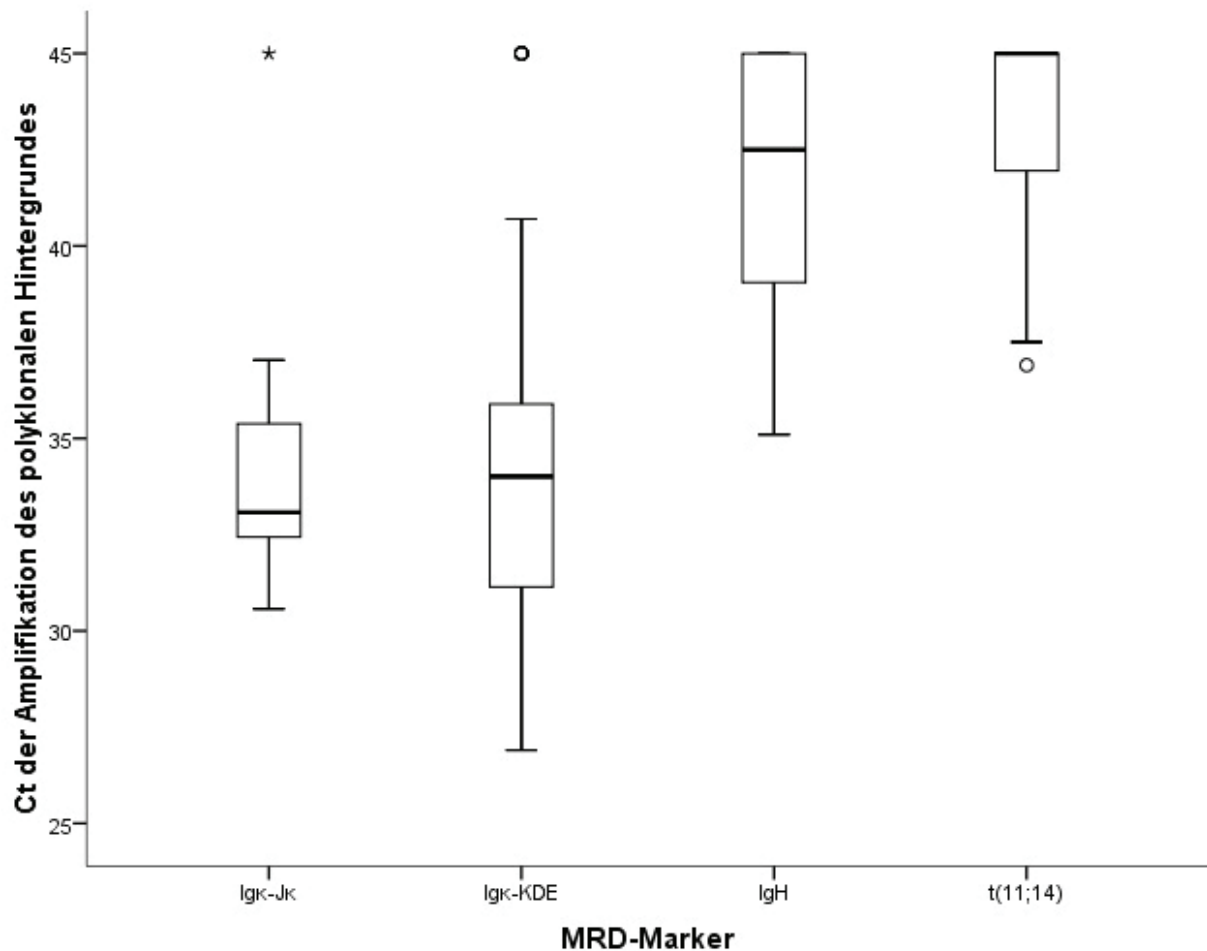


Abbildung a: Vergleich der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes der verschiedenen MRD-Marker als Box-Whisker-Plot (Median, Interquartilenabstand (IQR), Whiskers $\pm 1,5$ IQR, °: Ausreißer im Bereich von 1,5 bis 3 IQR, *: Ausreißer außerhalb von 3 IQR). Ordinate: Ct der Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes.

Igκ-Jκ: n=10, Median 33,08, IQR 3,41; Igκ-KDE: n=30, Median 34,01, IQR 5,01; IgH: n=63, Median 42,50, IQR 6; t(11;14): n=60, Median 45,00, IQR 3,08.

Die Testung auf Unterschiede der zentralen Tendenz in den Ergebnissen der vier Marker erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung mit Dunn-Bonferroni (p_{korrr})). Nach Korrektur des Signifikanzniveaus waren die Unterschiede zwischen Igκ-KDE und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,00024$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 0,0015$, $n = 25$), Igκ-KDE und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,00002$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 0,0002$, $n = 22$), Igκ-Jκ und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,008$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 0,048$, $n = 9$) sowie Igκ-Jκ und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,008$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 0,048$, $n = 9$) signifikant.

Kein signifikanter Unterschied bestand bei den Paarungen Igκ-Jκ und Igκ-KDE (exakte Signifikanz $p = 1,0$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 1,0$, $n = 5$), sowie IgH und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,026$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korrr}} = 0,156$, $n = 49$).

Igκ - Immunglobulinleichtkette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), Ct - Cycle threshold, MRD - minimal residual disease.

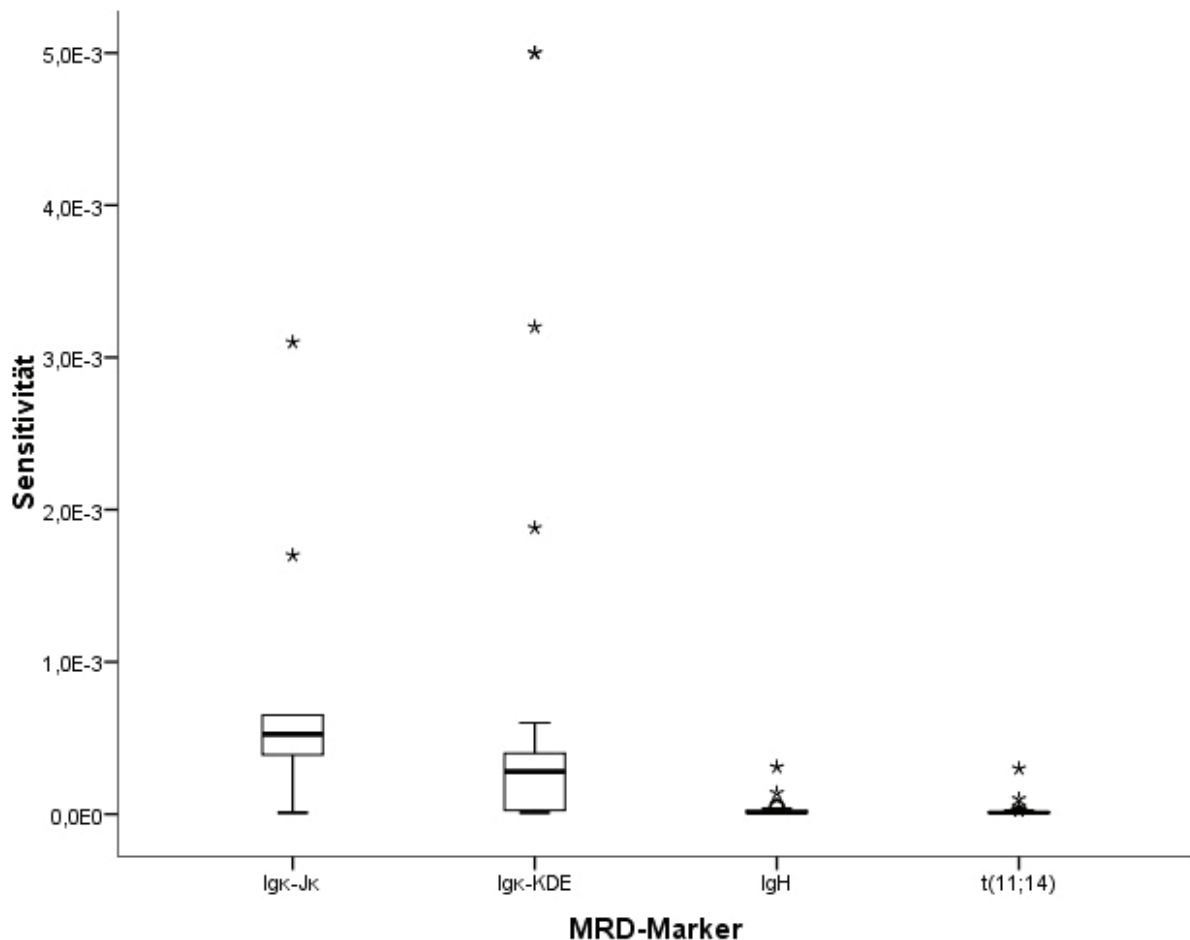


Abbildung b: Vergleich der Sensitivität der verschiedenen MRD-Marker als Box-Whisker-Plot (Median, Interquartilenabstand (IQR), Whiskers $\pm 1,5$ IQR, °: Ausreißer im Bereich von 1,5 bis 3 IQR, *: Ausreißer außerhalb von 3 IQR). Ordinate: Sensitivität der RQ-PCR-Assays.

Ig κ -J κ : n=10, Median $5,3 \times 10^{-4}$, IQR $5,9 \times 10^{-4}$; Ig κ -KDE: n=30, Median $2,8 \times 10^{-4}$, IQR $3,9 \times 10^{-4}$; IgH: n=63, Median $1,0 \times 10^{-5}$, IQR $1,5 \times 10^{-5}$; t(11;14): n=60, Median $1,0 \times 10^{-5}$, IQR $5,0 \times 10^{-5}$.

Die Testung auf Unterschiede der zentralen Tendenz in den Ergebnissen der vier Marker erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung mit Dunn-Bonferroni (p_{korr})). Nach Korrektur des Signifikanzniveaus waren die Unterschiede zwischen Ig κ -KDE und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,00011$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,0007$, $n = 19$), Ig κ -KDE und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,00024$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,0014$, $n = 17$) sowie Ig κ -J κ und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,008$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,048$, $n = 9$) signifikant.

Kein signifikanter Unterschied bestand bei den Paarungen Ig κ -J κ und Ig κ -KDE (exakte Signifikanz $p = 0,500$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 4$) sowie IgH und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,638$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 49$). Die Paarung Ig κ -J κ und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,031$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,186$, $n = 8$) zeigte nach Signifikanzkorrektur keinen signifikanten Unterschied mehr. Angesichts des deutlichen Unterschieds in der deskriptiven Statistik dürfte es sich hierbei a.e. um einen Effekt der kleinen Fallzahl und der hier gewählten sehr konservativen Methode der Signifikanzkorrektur handeln.

Ig κ - Immunglobulinleichtkette kappa, J κ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), MRD - minimal residual disease.

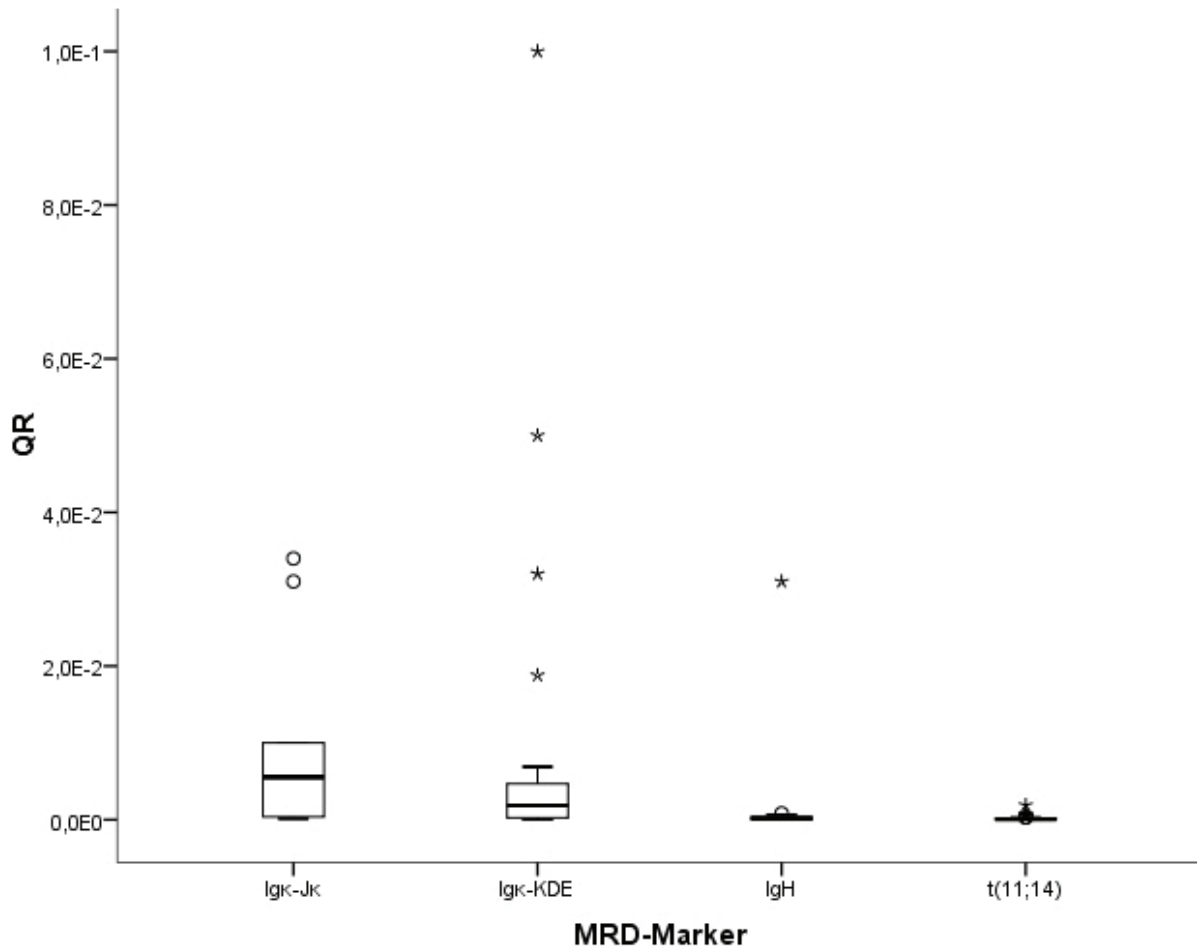


Abbildung c: Vergleich des quantitativen Messbereiches (QR) der MRD-Marker als Box-Whisker-Plot (Median, Interquartilenabstand (IQR), Whiskers $\pm 1,5$ IQR, °: Ausreißer im Bereich von 1,5 bis 3 IQR, *: Ausreißer außerhalb von 3 IQR). Ordinate: quantitativer Messbereich der RQ-PCR-Assays.

Igκ-Jκ: n=10, Median $5,6 \times 10^{-3}$, IQR $1,5 \times 10^{-2}$; Igκ-KDE: n=30, Median $1,9 \times 10^{-3}$, IQR $4,8 \times 10^{-3}$; IgH: n=62, Median $1,8 \times 10^{-4}$, IQR $2,8 \times 10^{-4}$; t(11;14): n=60, Median $7,0 \times 10^{-5}$, IQR $1,0 \times 10^{-4}$.

Die Testung auf Unterschiede der zentralen Tendenz in den Ergebnissen der vier Marker erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung mit Dunn-Bonferroni (p_{korr})). Nach Korrektur des Signifikanzniveaus waren die Unterschiede zwischen Igκ-KDE und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,00042$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,0025$, $n = 19$), Igκ-KDE und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,00037$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,0022$, $n = 17$), Igκ-Jκ und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,008$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,048$, $n = 9$), Igκ-Jκ und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,008$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,048$, $n = 8$) sowie IgH und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,00015$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,0009$, $n = 48$) signifikant.

Kein signifikanter Unterschied bestand bei der Paarung Igκ-Jκ und Igκ-KDE (exakte Signifikanz $p = 0,875$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 4$).

Igκ - Immunglobulinleichtkette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), QR - quantitativer Messbereich, MRD - minimal residual disease.

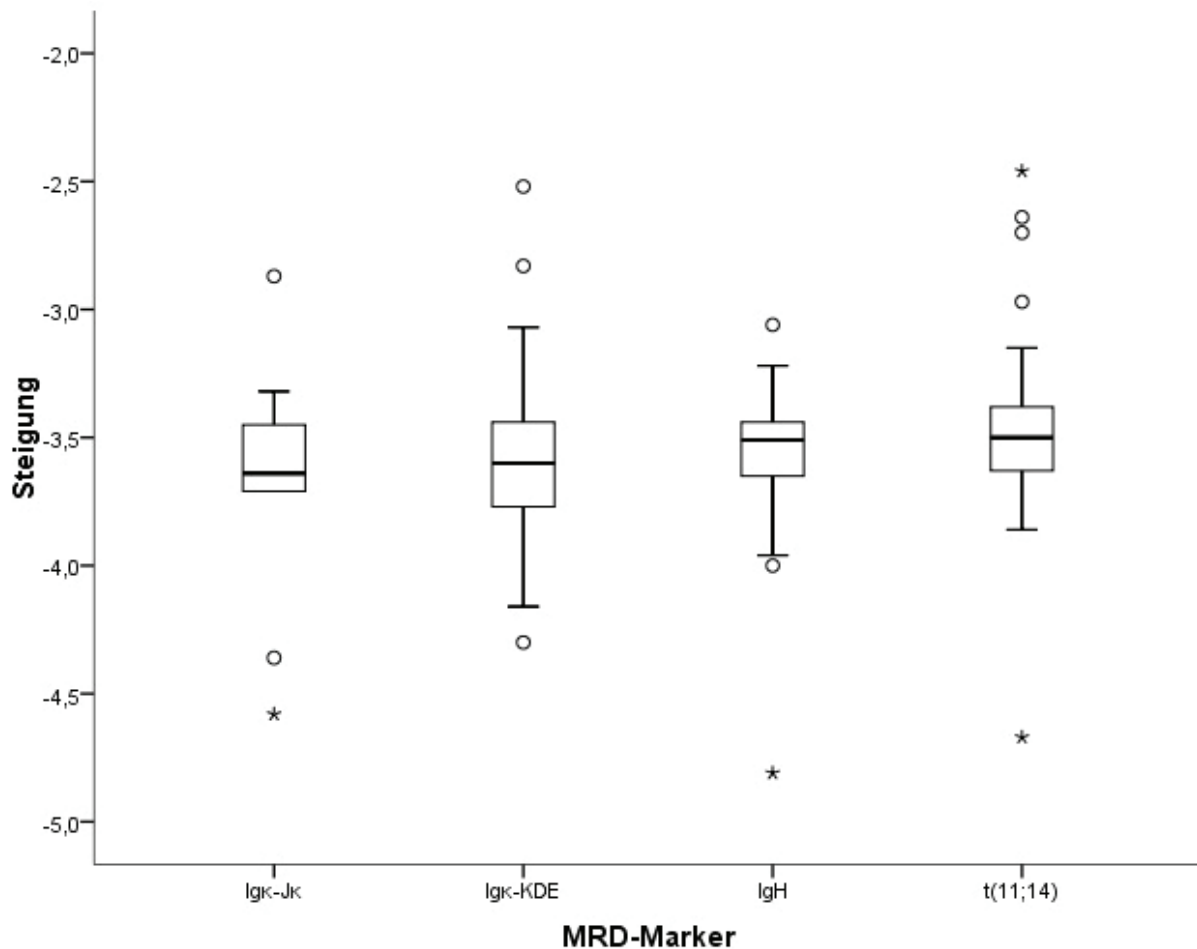


Abbildung d: Vergleich der Steigung der Standardkurve der MRD-Marker als Box-Whisker-Plot (Median, Interquartilenabstand (IQR), Whiskers $\pm 1,5$ IQR, °: Ausreißer im Bereich von 1,5 bis 3 IQR, *: Ausreißer außerhalb von 3 IQR). Ordinate: Steigung der Standardkurve.

Igκ-Jκ: n=10, Median -3,64, IQR 0,46; Igκ-KDE: n=30, Median -3,6, IQR 0,34; IgH: n=61, Median -3,51, IQR 0,21; t(11;14): n=57, Median -3,5, IQR 0,28.

Die Testung auf Unterschiede der zentralen Tendenz in den Ergebnissen der vier Marker erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung mit Dunn-Bonferroni (p_{korr})). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Markern: Igκ-KDE und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,156$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,936$, $n = 18$), Igκ-KDE und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,520$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 16$), Igκ-Jκ und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,820$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 9$), Igκ-Jκ und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,672$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 8$), IgH und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,426$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 47$), Igκ-Jκ und Igκ-KDE (exakte Signifikanz $p = 0,625$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 4$).

Igκ - Immunglobulinleichtkette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), MRD - minimal residual disease.

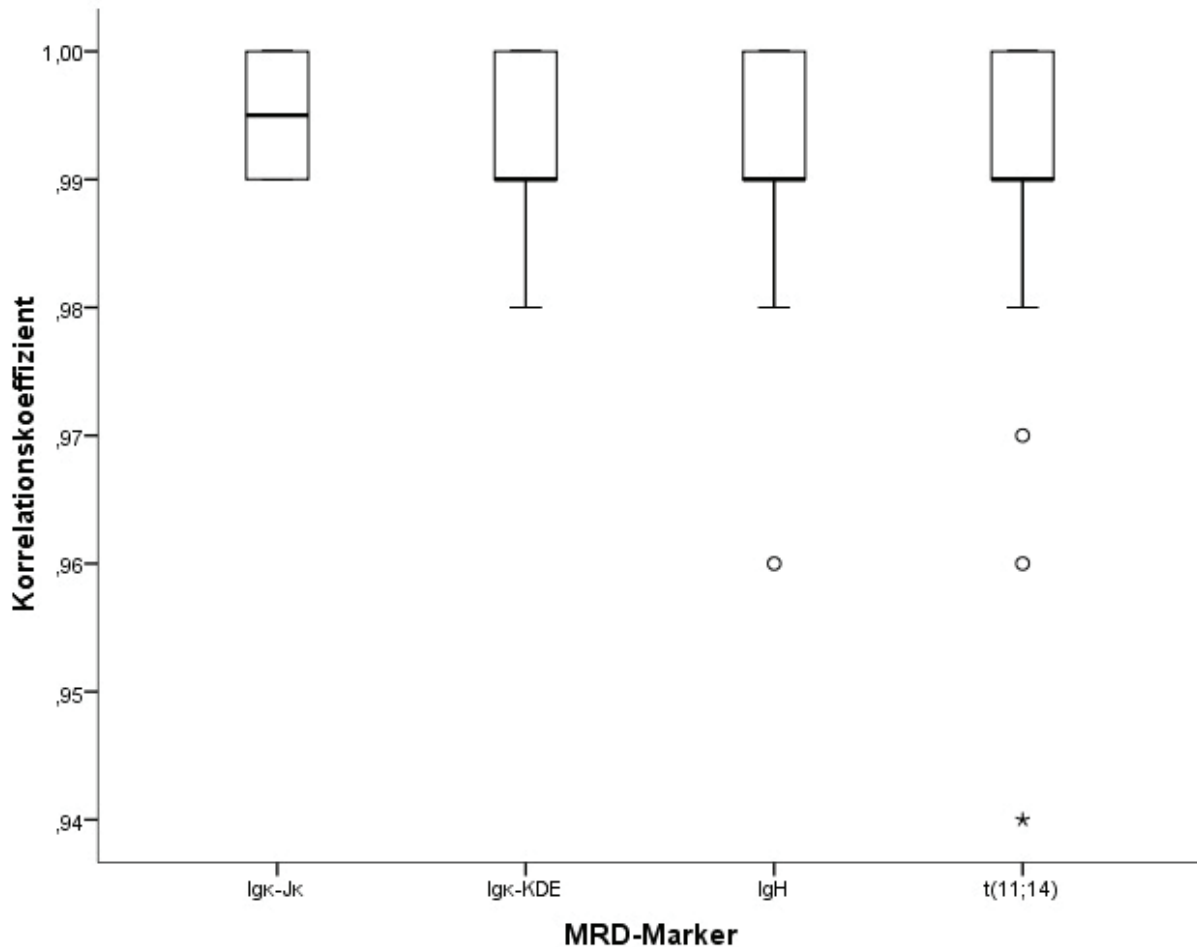


Abbildung e: Vergleich der Korrelationskoeffizienten der Standardkurve der MRD-Marker als Box-Whisker-Plot (Median, Interquartilenabstand (IQR), Whiskers $\pm 1,5$ IQR, °: Ausreißer im Bereich von 1,5 bis 3 IQR, *: Ausreißer außerhalb von 3 IQR). Ordinate: Korrelationskoeffizient der Standardkurve.

Igκ-Jκ: n=10, Median 0,995, IQR 0,1; Igκ-KDE: n=30, Median 0,99, IQR 0,1; IgH: n=61, Median 0,99, IQR 0,1; t(11;14): n=57, Median 0,99, IQR 0,1.

Die Testung auf Unterschiede der zentralen Tendenz in den Ergebnissen der vier Marker erfolgte mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, Korrektur des Signifikanzniveaus bei multipler Testung mit Dunn-Bonferroni (p_{korr})). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Markern: Igκ-KDE und IgH (exakte Signifikanz $p = 0,745$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 18$), Igκ-KDE und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,258$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 16$), Igκ-Jκ und IgH (exakte Signifikanz $p = 1,0$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 9$), Igκ-Jκ und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 1,0$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 8$), IgH und t(11;14) (exakte Signifikanz $p = 0,100$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 0,6$, $n = 47$), Igκ-Jκ und Igκ-KDE (exakte Signifikanz $p = 0,500$, korrigierte Signifikanz $p_{\text{korr}} = 1,0$, $n = 4$).

Igκ - Immunglobulinleichtkette kappa, Jκ - Joining-Genregion der Immunglobulinleichtkette kappa, KDE - kappa deleting element, IgH - Immunglobulinschwerkette, t(11;14) - Translokation t(11;14), MRD - minimal residual disease.

7.6 Ergebnisse der paarweisen Testung der Längen der N-Region

Tabelle G: detaillierte Ergebnisse der paarweisen Testung der Längen der N-Region zueinander in Bezug auf Sensitivität, QR und Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes durch Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) mit Signifikanzkorrektur nach Dunn-Bonferroni (p_{korr})

*: signifikant zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ vor Signifikanzkorrektur

#: signifikant nach Signifikanzkorrektur

QR - quantitative Range, BC-Amplif. - Amplifikation des polyklonalen Hintergrundes (BC - buffy coat), Std. Teststat. - standardisierte Teststatistik

| | | ≥4 zu 3 | ≥4 zu 2 | ≥4 zu 1 | ≥4 zu 0 | 3 zu 2 | 3 zu 1 | 3 zu 0 | 2 zu 1 | 2 zu 0 | 1 zu 0 |
|--------------|-------------------|---------|---------|---------------|------------------|--------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| Sensitivität | Teststatistik | 7,917 | 6,333 | 15,306 | 18,795 | 1,583 | 7,389 | 10,879 | 8,972 | 12,462 | 3,49 |
| | Std. Teststat. | 1,256 | 1,005 | 2,7 | 3,467 | 0,235 | 1,202 | 1,837 | 1,459 | 2,104 | 0,665 |
| | p | 2,09 | 0,315 | 0,07* | 0,001* | 0,814 | 0,23 | 0,066 | 0,145 | 0,035* | 0,506 |
| | p _{korr} | 1 | 1 | 0,69 | 0,005# | 1 | 1 | 0,662 | 1 | 0,353 | 1 |
| QR | Teststatistik | 9,375 | 9,292 | 16,375 | 23,239 | 0,083 | 7 | 13,864 | 7,083 | 13,947 | 6,864 |
| | Std. Teststat. | 1,485 | 1,472 | 2,883 | 4,279 | 0,012 | 1,136 | 2,337 | 1,15 | 2,351 | 1,306 |
| | p | 0,138 | 0,141 | 0,04* | 0,00002* | 0,99 | 0,256 | 0,019* | 0,25 | 0,19 | 0,191 |
| | p _{korr} | 1 | 1 | 0,039# | 0,0016# | 1 | 1 | 0,194 | 1 | 0,187 | 1 |
| BC-Amplif. | Teststatistik | 8,917 | 11,75 | 16,972 | 26,659 | 2,833 | 8,056 | 17,742 | 5,222 | 14,909 | 9,687 |
| | Std. Teststat. | 1,414 | 1,863 | 2,991 | 4,912 | 0,42 | 1,309 | 2,993 | 0,848 | 2,515 | 1,845 |
| | p | 0,157 | 0,062 | 0,003* | 0,000006* | 0,674 | 0,191 | 0,003* | 0,396 | 0,012* | 0,065 |
| | p _{korr} | 1 | 0,625 | 0,028# | 0,0006# | 1 | 1 | 0,028# | 1 | 0,119 | 0,65 |

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. C. Baldus und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. med. C. Pott danke ich für die sehr gute Betreuung und Geduld. Ohne ihre Unterstützung und ihren Rat wäre diese Arbeit nicht zu einem Ende gekommen.

Dr. rer. nat. B. Kehden danke ich für die Beantwortung meiner Fragen zu speziellen Aspekten der statistischen Analyse.

Dipl.-Biochem. K. Heine danke ich sehr für das Lektorat dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hämatologie Labors Kiel, Sektion für hämatologische Spezialdiagnostik der Klinik für Innere Medizin II – Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel danke ich für die fachliche Unterstützung und freundliche Aufnahme in das Labor. Mein besonderer Dank gilt stellvertretend Ariane S., Franziska R. und Cathrin J-K.

Meiner Familie danke ich für die jahrelange Unterstützung, die mich diese Arbeit hat vollenden lassen. Sophie, Margarethe und Elisabeth, ich bin jeden Tag unendlich dankbar, dass es euch in meinem Leben gibt.