Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Medizinische Fakultät Klinik und Poliklinik für Innere Medizin C, Transplantationszentrum Hämatologie/Onkologie Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Dölken

Nachweis von Myelomzellen durch CDRIII-klonspezifische real-time-PCR

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr.med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2006

vorgelegt von: Volker Koberstein geb.am: 07.09.1976 in: Paderborn



Dekan:

1.Gutachter

2.Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. KroemerProf. Dr. G. Dölken (Greifswald)Prof. Dr. J. Finke (Freiburg i.Br.)

Tag der Disputation:

2

31. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

- 1.1 Das multiple Myelom ein Überblick
 - 1.1.1 Definition
 - 1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie
 - 1.1.3 Diagnostik und Stadieneinteilung
 - 1.1.4 Therapie und Verlaufskontrolle
- 1.2 Nachweis von Tumorzellen bei klonalen B-Zell-Erkrankungen
- 1.3 Aufbau eines Antikörpers
- 1.4 Immunglobulingene und Entstehung des Antikörperrepertoires
- 1.5 Genetische Grundlagen der Antikörperspezifität
- 1.6 Der Aufbau der V_H-Domäne
 - 1.6.1 Somatische Mutationen und VH-Gen-Gebrauch bei B-Zell-Tumoren
 - 1.6.2 Die CDR3-Region
- 1.7 Minimale Residualerkrankung (MRD) beim multiplen Myelom
- 1.8 Zielstellung der Arbeit

2 Materialien

- 2.1 Geräte
- 2.2 Chemikalien / Reagenzien
- 2.3 Enzyme
- 2.4 Oligonukleotide
- 2.5 Software
- 2.6 Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

3 Methoden

- 3.1 Präparation von zellulärer DNA
- 3.2 Präparation von zellulärer mRNA
- 3.3 Synthese von cDNA
- 3.4 Die Polymerasekettenreaktion
 - 3.4.1 Funktionsweise der PCR
 - 3.4.2 Quantitative "real-time"-PCR
 - 3.4.3 Kontaminationsvermeidung bei PCR-Untersuchungen
- 3.5 Auswahl der Primer und Sonden
- 3.6 Bestimmung der Anzahl der untersuchten Zellen
- 3.7 Durchführung der PCR
 - 3.7.1 PCR-Ansatz
 - 3.7.2 Reaktionsbedingungen der PCR
- 3.8 Agarosegelelektrophorese
- 3.9 Sequenzierung
 - 3.9.1 Aufbereitung der DNA-Probe zur Sequenzierung
 - 3.9.2 Sequenzierreaktion
 - 3.9.3 Auswertung der Sequenzanalysen
- 3.10 Quantitative Verlaufskontrollen an peripheren Blut- und Knochenmarksproben von Patienten mit multiplem Myelom

4 Ergebnisse

- 4.1 PCR-Ansätze und Identifikation des Myelomklons
- 4.2 Zusätzliche Banden in der Elektrophorese
- 4.3 Sequenzierung und Analyse des VDJ-Rearrangements
 - 4.3.1 Analyse der VH-Gene
 - 4.3.2 Analyse der CDR3-Region
- 4.4 Inzidenz somatischer Mutationen
- 4.5 Funktion der Taqman-Sonde und der Primer

- 4.6 Bestimmung und Kontrolle des Tumorklon-spezifischen Primers (ASO-Primer)
- 4.7 Quantitative PCR-Analysen im Krankheitsverlauf von Patienten mit multiplem Myelom

5 Diskussion

- 5.1 Etablierung einer Allel-spezifischen PCR (ASO-PCR) f
 ür rearrangierte V_H-Gene des IgH-Locus bei Patienten mit multiplem Myelom
- 5.2 Rearrangement der Vh, Dh und Jh-Gene beim multiplen Myelom
- 5.3 Stabilität des VDJ-Rearrangements im Krankheitsverlauf und genetische Stabilität des Myelomklons
- 5.4 Technische Probleme verursacht durch somatisch hypermutierte VH-Gene von Plasmozytomzellen
- 5.5 Vergleich etablierter und neuer Methoden zur Diagnose und Verlaufskontrolle beim multiplen Myelom
- 5.6 Praktische Anwendung der allel-spezifischen PCR (ASO-PCR) und klinische Relevanz der MRD-Diagnostik bei neuen Therapieansätzen
 - 5.6.1 Allgemeines
 - 5.6.2 Multiples Myelom und autologe Stammzelltransplantation
 - 5.6.3 Allogene Transplantation und neue Therapieansätze

Einleitung 1.1 Das multiple Myelom - ein Überblick 1.1.1 Definition

Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation wird das multiple Myelom in die malignen B-Zell-Lymphome eingeordnet[1]. Es kommt zu einer diffusen oder multilokulären Infiltration des Knochenmarks durch monoklonale neoplastische Plasmazellen, die sich im überwiegenden Teil der Fälle durch die Produktion eines monoklonalen Immunglobulins (Ig) bzw. von Ig-Leichtketten (Bence-Jones-Protein: kappa oder lambda) auszeichnen. Diese sind als Tumormarker in Blut und Urin quantitativ meßbar und können zur Abschätzung der Tumorzellmasse und Verlaufskontrolle dienen (s.u.). Nur bei einem kleinen Anteil der Myelome kommt es nicht zur Sekretion eines Immunglobulins.

Ig-Klasse	Häufigkeit
IgG	61%
IgA	23%
Leichtketten	10%
IgM	<1%
IgD	<1%
IgE	<1%
biklonal	1%
asekretorisch	5%

Tab. 1: Paraproteine des multiplen Myeloms

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Die Ätiologie des multiplen Myeloms ist nach wie vor unbekannt. Gehäuft kommt die Erkrankung nach Strahlenexposition vor, Chemikalien und Umweltgifte werden ebenfalls als Auslöser diskutiert. Bei neueren Untersuchungen zeigte sich, daß in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit multiplem Myelom Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (HSHV) nachweisbar war[2], welches die befallenen Zellen zur Produktion von Interleukin-6 anregt. Interleukin-6 stellt neben anderen Zytokinen einen wichtigen Wachstumsfaktor für die Proliferation des Tumorzellklons im Knochenmark dar[3;4]. Desweiteren erscheint eine genetische Prädisposition in Anbetracht unterschiedlicher Inzidenzen bei verschiedenen Bevölkerungsgruppen (erhöht bei Schwarzafrikanern, erniedrigt bei Asiaten), in Abhängigkeit von genetischen Markern (HLA-B5) und bei familiärem Auftreten wahrscheinlich[5]. Ein 4,5 fach erhöhtes Risiko für ein multiples Myelom besteht bei HIV-Infektion, geringer bei Hepatitis A/B/C/D und EBV[6]. Durchschnittlich beträgt die jährliche Inzidenz in den USA 4/100000 und steigt mit dem Alter stark an (30-40/100000 bei 80jährigen)[6].

Als sogenanntes "Prämyelom" wird die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) betrachtet. In einer Studie von Kyle et al.[7] stieg das Risiko, an einem Plasmozytom oder einer anderen Plasmazelldyskrasie zu erkranken, pro Jahr um etwa 1%.

1.1.3 Diagnostik und Stadieneinteilung

Zur Stellung der Diagnose eines MM unterscheidet man zwischen Haupt- und Nebenkriterien, wobei mindestens ein Haupt- und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien erfüllt sein müssen. Hauptkriterien:

- Knochenmarkplasmozytose von > 30%
- Nachweis eines Plasmozytoms in der Biopsie
- Nachweis eines M-Gradienten: IgG > 3,5g/dl, IgA > 2g/dl (im Serum)

Bence-Jones-Proteinurie von > 1g/24h

Nebenkriterien:

- Knochenmarkplasmozytose von 10-30%
- Nachweis eines M-Gradienten (geringere Werte als in den Hauptkriterien)
- Osteolysen
- Immunglobulinmangel (< 50% des Normwertes)

Zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf das Vorliegen eines MM wird weitere Basisdiagnostik durchgeführt (Anamnese, klinische Untersuchung, Labordiagnostik, Knochenmarkhistologie und -zytologie, Röntgen nach Pariser Schema). Insgesamt bildet die zyto- und histologische Knochenmarkuntersuchung das diagnostische Fundament, da hier nicht nur Aussagen über die Blutbildung und den Knochenbau möglich sind, sondern auch Informationen zur Immunzytologie, Zytogenetik und Molekularbiologie gewonnen werden können.

Da beim MM von Beginn der Erkrankung an das Knochenmark infiltriert ist, wurde von *Durie* und *Salmon*[8]eine Stadieneinteilung vorgeschlagen, die sich in erster Linie auf die Abschätzung der Tumorzellmasse und auf klinische Kriterien zum Diagnosezeitpunkt stützt.

Stadium I	(alle folgenden Kriterien müssen erfüllt sein) - Hämoglobin > 100 g/l
•	 Serumkalzium normal Knochenstruktur normal (beurteilt anhand konventioneller Röntgenuntersuchungen)
	 Paraproteinkonzentration gering (Serum: < 50 g/l für IgG, < 30 g/l für IgA; Urin: Bence-Jones-Protein < 4 g/24 Std).
Stadium II	Patienten, die nach den Kriterien weder zu Stadium I noch zu Stadium III gehören.
Stadium III	(mindestens eins der folgenden Kriterien ist erfüllt)
	- Hämoglobin < 85 g/l
	 Serumkalzium erhöht
	 fortgeschrittene Knochenläsionen
	- Paraproteinkonzentration hoch
	(Serum: > 70 g/l für IgG, > 50 g/l für IgA, Urin: Bence-Iones-Protein > 12 g/24 Std).

Abb. 1.1: Klinische Stadieneinteilung nach Durie und Salmon[8]

Allgemein kann festgestellt werden, daß die Prognose umso ungünstiger ist, je ausgeprägter die Knochenmarkinfiltration ist. Eine besonders schlechte Prognose haben diejenigen Patienten, bei denen sich zytogenetisch eine Deletion 13q nachweisen läßt[9;10]. Auch der Grad der zytologischen Atypien besitzt prognostische Bedeutung, so daß zumeist dreigliedrige Grading-Systeme unterschieden werden (reifzellig, mäßig reifzellig und unreifzellig). Hierbei ist auch der sogenannte Plasmazell-Labeling-Index (PCLI) wichtig, durch den die Proliferationsrate monoklonaler Plasmazellen bestimmt wird und der prognostische Aussagen ermöglicht[11].

1.1.4 Therapie und Verlaufskontrolle

Obwohl das multiple Myelom immer noch eine unheilbare Erkrankung darstellt ist es in den letzten Jahren gelungen, den Anteil der Patienten mit gutem Ansprechen auf die Chemotherapie zu erhöhen und die Dauer eines erreichten Remissionszustandes zu verlängern. Für Patienten < 60 Jahren stellt die zweimalige Hochdosischemotherapie mit jeweils folgender autologer Stammzelltransplantation ("Tandemtransplantation") zum jetzigen Zeitpunkt den Standard dar[12]. Vor allem bei Patienten mit zytogenetischem Risikofaktor (13q-) wird nach der ersten autologen eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt[13;14].

Die Kriterien zur Bewertung des Ansprechens auf die jeweilige Therapie und zur Verlaufsbeurteilung sind zur Zeit nicht einheitlich definiert. In allen genutzten Bewertungsschemata nimmt jedoch die quantitative Messung des jeweiligen Paraproteins eine zentrale Stellung ein. Da die Immunglobulinsyntheserate der Plasmazellen nahezu konstant ist, besteht eine enge Korrelation zwischen der Paraproteinkonzentration im Serum/Urin und der Tumorzellmasse. Bei nicht sezernierenden Klonen verbleibt neben wenig aussagekräftigen Kriterien wie der Normalisierung einer eventuell vorbestehenden Hypercalcämie und Veränderungen im Blutbild nur die Knochenmarkuntersuchung. Um eine komplette Remission diagnostizieren zu können ist der zytologische Knochenmarkbefund obligat, der weniger als 5% Plasmazellen aufweisen dar[15].

Obwohl im Rahmen von Transplantationsstudien bis zu 80% aller Patienten den Zustand der kompletten Remission erreichen, kommt es bei einem hohen Prozentsatz der Erkrankten zu einem Relaps. Ein solcher Relaps kann sich beim MM durch Anstieg des jeweiligen Paraproteins, neu auftretende oder sich vergrößernde Osteolysen und einen Anstieg der Plasmazellen im Knochenmark auf über 5% dokumentieren. An dieser Stelle muß die Frage gestellt werden, ob der Patient von einer früheren Diagnose des Relaps im Zustand der klinischen Remission und einer frühzeitigen Therapie mit neuen Substanzen, wie z.B. Bortezomib, profitieren könnte.

1.2 Nachweis von Tumorzellen bei klonalen B-Zell-Erkrankungen

Bei malignen B-Zell-Erkrankungen wie B-Zell-Leukämien, Lymphomen und dem MM findet man mit der tumorklonspezifischen Rekombination der Immunglobulingene eine geeignete genetische Zielsequenz, um auch minimale Mengen residualer Tumorzellen nachweisen zu können[16]. Das Wissen über die genetischen Grundlagen der Immunglobulinsynthese wurde interessanterweise v.a. aus Studien an eben diesen Erkrankungen gewonnen. Susumu Tonegawa führte 1976 den experimentellen Beweis, daß es in Myelomzellen zur Umlagerung ("Rearrangement") von Antikörpersegmenten kommt[17] und bestätigte damit die bereits 1965 von Dreyer und Bennett aufgestellte Hypothese, daß die Antikörpervielfalt im Säugergenom die Rekombination von DNA zur Grundlage hat. Hieter und Korsmeyer erweiterten diese neuen Erkenntnisse durch weitere Studien anfang der 80er Jahre[18],[19]. Sie untersuchten im Zusammenhang mit Immunglobulinrearrangements auch die Expression von Antikörpern auf der Oberfläche von Zellen bei ALL. Membranständige Antikörper setzen die komplette Ig-Gen-Umlagerung voraus, diese ist aber nicht bei allen B-Zell-Tumoren der Fall. So besitzen B-lymphoblastische Lymphome und Leukämien, die von frühen Vorstufen der B-Zell-Reihe ihren Ursprung haben, aufgrund teils inkompletten Ig-Gen-Rearrangements keine Oberflächenantikörper. Die Untersuchung des Rekombinationsvorgangs liefert weiterhin auch wichtige Informationen über die Klonalität, den zellulären Ursprung und den Grad der B-Zell-Differenzierung lymphoproliferativer Neoplasien[19], so auch beim MM.

Die *in vitro* Amplifikation spezifischer RNA/DNA mittels PCR ermöglicht den Nachweis sehr geringer Zellzahlen (bis zu einer neoplastischen Zelle in 10⁶ normaler Zellen)[20]. Diese Methode wurde in den letzten Jahren immer weiter optimiert, z.B. durch Anwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen[21], "hot start" Technik zur Erhöhung der Spezifität[22], Verwendung der UNG (Uracil-N-Glykosidase) zur Prävention von Kontaminationen durch früher amplifizierter DNA[23] bis zur Einführung der quantitativen "real-time" PCR[24]. Die Voraussetzung zur Anwendung der PCR ist, daß der Tumorzellklon einen für ihn spezifischen genetischen "Marker" im Sinne einer spezifischen RNA/DNA-Sequenz besitzt, der in jeder Tumorzelle konstant vorkommt. Bis heute nutzt man solche "Marker" in Form von charakteristischen Chromosomenaberrationen (z.B. t(9;22) BCR-ABL), klonalen Genrearrangements (IgH-CDR3-Rearrangement), tumorspezifischen Genmutationen (Kras-Mutationen, p53-Mutationen) und gewebespezifischer Genexpression als Zielsequenz für die PCR-Amplifikation. Die Grundlagen zur Anwendung des Immunglobulingenrearrangements zum Nachweis von Tumorzellen sollen im Folgenden genauer dargestellt werden.

1.3 Aufbau eines Antikörpers

Immunglobuline werden von B-Lymphozyten produziert und kommen in zwei Formen vor, einer membranständigen und einer sezernierten, die sich voneinander nur geringfügig unterscheiden. Die Antigenspezifität ist dabei für jeden B-Zell-Klon charakteristisch, der folglich also auch nur ein typisches Immunglobulin exprimiert[25]. Dabei erfüllen diese hochspezifischen Glykoproteine im wesentlichen zwei Aufgaben: a) die Antigenerkennung und b) die Interaktion mit Effektorzellen und Effektormolekülen. Die beiden Funktionen des Ig-Moleküls spiegeln sich auch in ihrer bifunktionellen Struktur wieder, wobei der variable Teil die Antigenspezifität gewährleistet, der konstante Teil dagegen die Effektormechanismen auslöst und sich zwischen den verschiedenen Klassen und Subklassen (Isotypen) der Immunglobuline unterscheidet Die Grundstruktur ist gekennzeichnet durch je zwei identische schwere (H-Ketten für "heavy chain", Molekulargewicht 50-70 kDa) und zwei identische leichte Ketten (L-Ketten, um 25kDa). Diese sind durch interund intramolekulare Disulfidbrücken[26] und Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert und falten sich zu bestimmten globulären Regionen, die man Domänen nennt (zwei je L-Kette, vier bis fünf pro H-Kette, je nach Subklasse) und die jeweils etwa 110 Aminosäurereste umfassen. Die fünf Klassen der Immunglobuline (IgM, IgG, IgA, IgD und IgE) sind durch ihre H-Kette charakterisiert, die man als - μ , - δ , - γ , - ϵ , und - α bezeichnet. Bei der jeweils kombinierten L-Kette handelt es entweder um die Klasse κ oder λ .

Die Antigenbindungsstelle (auch Fab-Region: Fragment-antigen-binding) wird gemeinsam durch die jeweils N –terminale Domäne der H- und L-Kette gebildet, die sich je Antikörper durch ihre spezifische Aminosäuresequenz unterscheidet und deshalb als *variable* Region (Vh für schwere Kette, Vl für leichte Kette) bezeichnet wird[27]. Die weiter zum Carboxylende gelegenen Domänen stellen den relativ *konstanten* Teil des Moleküls dar (auch Fc-Region: Fragment cristallisable), weshalb sie bei der leichten Kette CL-Region, bei der schweren Ch1-,Ch2- und Ch3-Region (IgG-Molekül) genannt werden. Zwischen der Ch1- und der Ch2- Domäne liegt ein Molekülbereich, der durch eine relativ hohe Flexibilität variable Raumstrukturen ermöglicht, die sogenannte Gelenkregion ("hinge region").

Innerhalb der V-Regionen gibt es Bereiche, die eine besonders große Variabilität aufweisen, die sog. hypervariablen Regionen. Diese Sequenzbereiche der H- und L-Ketten, auch "complementary determining regions" (CDR) genannt, liegen im fertig gefalteten Molekül benachbart und bilden

die spezifische Bindungsstelle für ein Antigen. Dabei determinert die Kombination von jeweils drei hypervariablen Regionen der L-Kette (CDR 1-3) und drei bis vier der H-Kette die spezifische Komplementarität des Antigenbindungsortes. Die CDR-Regionen befinden sich eingebettet in relativ invariante Sequenzbereiche. Letztere rahmen gleichsam die CDR- Regionen ein und werden deshalb als "framework- regions" bezeichnet, von denen es jeweils vier gibt (FRW 1-4). Einzelne Keimbahngene (VH1-7) kodieren dabei komplett die CDR1- und CDR2-Regionen inklusive ihrer FWRs (1-3)[28;29]. Die CDR3-Region dagegen setzt sich durch Rekombination verschiedener kleiner Genabschnitte zusammen[30;31].



Abb.1.2: Die Struktur eines Immunglobulins der Klasse G [25]



Abb. 1.3: Zusammenhang zwischen der Immunglobulin-Proteinstruktur und Immunglobulin-Genen[32]

1.4 Immunglobulingene und Entstehung des Antikörperrepertoires

Der Mensch scheint befähigt zu sein, gegen eine nahezu unbegrenzte Vielfalt von Antigenen spezifische Antikörper bilden zu können. Entspräche analog der Keimbahntheorie jedem einzelnen Antikörper auch ein eigenes Gen, so müßten Antikörpergene den Hauptteil des Säugergenoms stellen. Aus diesem Grund vermuteten Dreyer und Bennett[33], daß getrennte Gensegmente die konstanten und variablen Teile der Immunglobulinkette kodieren, und zwar nur jeweils ein Gen für den C-Teil und viele verschiedene für den V-Teil. Im Verlauf der B-Lymphozyten-Differenzierung sollten sich diese Gensegmente neu kombinieren, als Grundprinzip also ein Rekombinationsvorgang auf DNA-Ebene für die Entstehung der Antikörperdiversität

verantwortlich sein. Diese Hypothese bestätigte sich erst Jahre später [17;34].

Die Immunglobulingene sind bei der leichten Kette für Kappa auf Chromosom 2q11, für lambda auf Chromosom 22q11 lokalisiert[35;36], während man die Schwerkettengene auf Chromosom 14q32.3 findet[37]. Weitere VH- und auch einige D-Segmente liegen auf den Chromosomen 15q11.2 und 16q11.2, die aber nicht zum funktionellen Antikörperrepertoir in vivo beitragen[38;39].

Die variable Domäne der leichten Ketten wird von zwei verschiedenen Gensegmenten kodiert, Vund J-Gen ("Joining"), bei der schweren Kette kommt das sogenannte D-Gensegment ("Diversity") hinzu. Ein C-Segment für den konstanten Bereich schließt sich bei beiden Ketten an. Die Anzahl der D-Segmente ist deutlich geringer als die der VH-Segmente (ca. 40 funktionelle Gene[40]) und beträgt ca. 30, bei den JH-Segmenten sind nur sechs verschiedene identifiziert worden. Somit stellt sich bei der schweren Kette das Genrearrangement als V-D-J-C-Rekombination dar. Die folgende Kombination verschiedener Mechanismen zur Erzeugung von Vielfalt schafft aus dieser relativ begrenzten Anzahl von Genen ein riesiges Repertoir von Antikörperspezifitäten.



 Abb. 1.4:
 Lokalisation der Gene f
ür die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline

 [41]

Die Grundlage der Antikörperdiversivität läßt sich vereinfacht in fünf Mechanismen zusammenfassen, wobei sowohl erbliche als auch erworbene Beiträge eine Rolle spielen:

- Keimbahngendiversität: V-, D- und J-Segmente liegen in multiplen Kopien vor (siehe Tabelle VH-Segmente) und nehmen nahezu eine Megabase auf dem IgH-Lokus ein[40]
- B. Kombinatorische Diversität: VJ- und VDJ- Segmente können in verschiedensten Kombinationen rearrangiert werden.[30]
- C. Junktionale Diversität: bei der Rekombination der Gensegmente kommt es in der dritten hypervariablen Region sowohl zur Deletion als auch zum additiven Anbau zusätzlicher Nukleotide (sog. "N"-Regionen) an den Verknüpfungsstellen, was zu weiterer Variabilität führt; bei Verschiebung des Leserasters kann es auch zu abortiven Umordnungen kommen (zwei von drei Umordnungen sind abortiv), so daß die B-Zelle keine funktionsfähigen Immunglobuline erzeugen kann[42]
- D. Multiple Kombination leichter und schwerer Ketten: prinzipiell kann jede leichte mit jeder schweren Kette kombiniert werden, was zu verschiedenen Antikörperspezifitäten führt, da beide Ketten an der Bildung des Antigenbindungsortes beteiligt sind
- E. Somatische Hypermutation: im Sinne einer "Affinitätsreifung" kommt es beim aktivierten Lymphozyten (in sekundären lymphatischen Organen) zu Punktmutationen in den rearrangierten Genen der variablen Region[32]; hierbei existieren Regionen, die davon in besonderem Maße betroffen sind [43]("Hotspots") [44]. Die konstanten Regionen sind davon nicht betroffen[45;46].

1.5 Genetische Grundlagen der Antikörperspezifität

Die komplette Nukleotidsequenz des 957kb langen DNA-Abschnittes, der die variable Region der menschlichen Immunglobulinschwerkette kodiert, wurde 1998 von Matsuda[40] publiziert und ergänzte und erweiterte damit die vorhergehenden Genkarten von Tomlinson[39] und anderen. Sie enthält insgesamt 123 VH-Segmente, welche sich aufgrund von Sequenzhomologien in sieben VH-Familien gruppieren lassen[28;39;40;47;48]. Innerhalb dieser Familien beträgt der Homologiegrad etwa 80%, wobei unterschiedliche Familien deutlich geringere Gemeinsamkeit aufweisen[28;29;47]. Die einzelnen VH-Gene liegen im Genom ungeordnet nach Familie[49] und

durch unterschiedlich lange Genabschnitte getrennt (im Durchschnitt ungefähr 6,8 kb)[40], aber alle gleichermaßen in Transkriptionsrichtung angeordnet[28]. Innerhalb der VH-Familien bildet die VH3-Familie mit 21 funktionellen Genen die größte Gruppe, gefolgt von VH1 und VH4. Bei Untersuchung des VH-Gen-Repertoirs in normalen B-Zellen zeigte sich, daß bestimmte Gene häufiger verwendet werden als andere [50]. So ist die VH3-Familie, darunter an erster Stelle das V3-23-Gen, deutlich überrepräsentiert. Die nur ein Mitglied umfassende VH7-Familie wird von anderen Autoren eher der Vh1-Familie zugerechnet [39;51]. Nur 44 der 123 VH-Gene werden in vivo wirklich verwendet, bei den restlichen 79 handelt es sich um Pseudogene. Diese große Zahl von Pseudogenen läßt bei der Frage nach Ursprung und Entwicklung des menschlichen Immunrepertoires auf häufige Genkonversionen und -deletionen sowie Mutationen innerhalb der Keimbahngene schließen[39;40]. Auffällig in diesem Zusammenhang sind auch die auf Chromosomen 15 und 16 translozierten VH-Gene[38;40]. Zusätzlich besitzt jedes V-Gen eine sog. Leadersequenz, die von dem Rest der V-Region durch eine nichtinformationstragende Sequenz getrennt ist. Die Leadersequenz enthält die Information für die hydrophoben Aminosäuren, die das Signalpeptid bilden, welches den Transport durch das Endoplasmatische Retikulum vermittelt. Nach der Kettensynthese (posttranslational) wird es wieder abgespalten[25;52].

Klassifikation		VH-Familie				Total		
	1	2	3	4	5	6	7	
Funktionelle Gene	9	3	21	7	1	1	1	44
Pseudogene	5	1	43	25	1	0	4	79
Total	14	4	65	32	2	1	5	123

Übersicht über humane VH-Gen-Segmente[40]

Weiter 3`-gelegen folgt das D-Region-Cluster, das sich aus 27 D-Segmenten zusammensetzt. Durch hohe Sequenzhomologie charakterisiert lassen sich diese analog den VH-Familien ebenfalls in sechs Gruppen einordnen. Schließlich folgt die JH-Region mit insgesamt sechs Segmenten, die sich sechs kb strangaufwärts des C-Bereiches befindet[53].

Bereits bei der Reifung der Stammzelle im Knochenmark zum B-Lymphozyten kommt es zu Umlagerungen der Keimbahnanordnung der Gene für schwere und leichte Ketten, da die Informationen für die variablen und konstanten Regionen auf verschiedenen Genen liegen. Die Deletion von DNA-Sequenzen und nicht das Spleißen von RNA bildet dafür die Grundlage. Gene für die leichten Ketten vom kappa-Typ lagern sich immer vor denen des lambda-Typs um, weswegen es nur zur Expression von Lambda-Ketten kommt, wenn die Umlagerung beider Kappa-Allele erfolglos war. Dennoch sind Fälle nachgewiesen, bei denen in normalen B-Zellen beide Leichtkettentypen exprimiert werden[54].



Abb. 1.5: VDJ Rekombination im IgH-Locus [25]

In der Pro-B-Zelle wird ein D-Segment mit einem J-Segment verbunden, in der Prä-B-Zelle ein V-Segment mit der zuvor gebildeten DJ-Kombination. Der Rekombinationsprozess der V-, Dund J-Segmente wird durch die Rekombinationsstellen flankierende, konservative DNA-Sequenzen gesteuert und durch ein Enzym, die VDJ-Rekombinase, katalysiert. Dieses Enzym kann durch zwei Gene aktiviert werden, die "recombinase activation genes" (RAG 1 und 2) [55-57], zu deren Expression es nur in unreifen Lymphozyten kommt und die einen Doppelstrangbruch in den RSS-Sequenzen (recombination signal sequences) induzieren. Störungen dieses Aktivierungsprozesses werden mit schweren Immundefekten, wie dem Omenn-Syndrom und der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID), in Zusammenhang gebracht[58;59]. Die RSS bestehen aus einem Block von sieben Nukleotiden (dem *Heptamer* 5`CACAGTG3`), einem sich anschließenden Spacer ("Abstandhalter") von 12 oder 23 bp und einem zweiten Block von neun Nukleotiden (dem Nonamer 5`ACAAAAACC3`)[60;61]. Die Sequenzen der Spacer variieren[62]; ihre Länge hingegen ist konstant und entspricht einer oder zwei Windungen einer DNA-Doppelhelix, sodaß das Heptamer und das Nonamer immer auf derselben Seite der Helix liegen. Hier bindet der Rekombinaseenzymkomplex. Nach der sogenannten 12/23-Regel kommt es nur zur Rekombination zwischen zwei Gensegmenten, wenn das eine eine RSS mit 12, das andere eine RSS mit 23 bp langem Spacer aufweist. So kann für die schwere Kette ein D-Segment mit einem J- und einem V-Segment verbunden werden, wobei eine direkte Verknüpfung von V- und J-Segment nicht möglich ist, da beide von 23-bp-Spacern und das D-Segment von 12-bp-Spacern flankiert sind [63]. Wie unter 1.4 C bereits erklärt erfolgt die Verknüpfung der einzelnen Segmente unpräzise, sowohl mit Deletion als auch Addition von Nukleotiden (dann N-Segmente genannt)[17;32;64]. Katalysiert wird dieser Prozess von einem weiteren Enzym, der TdT (terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase), was für weitere Diversität verantwortlich ist[64]. Zusätzlich kann es zu inversen Duplikationen kommen, die man als P-Elemente (Palindromische Nukleotide) bezeichnet[65]. Schließlich wird die gesamte V(D)JC-Sequenz inklusive der Introns in eine mRNA transkribiert und in ein Protein translatiert[27].



Abb. 1.6:Die Heptamer-Nonamer-Signale für die Umlagerung der Antikörpergene (nach
Watson[25])

1.6 Der Aufbau der VH-Domäne

1.6.1 Somatische Mutationen und VH-Gen-Gebrauch bei B-Zell-Tumoren

Jede B-Zelle beginnt die Immunantwort mit der Expression von IgM, welches immer der erste Antikörper der Immunantwort ist. Während der Replikation dieser B-Zellen in den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe, in denen der erste Antigenkontakt erfolgt und der Prozess der Selektion und "Affinitätsreifung" stattfindet[66], kommt es zu einer Vielzahl somatischer Mutationen. Durch einen einzigen dadurch induzierten Aminosäureaustausch kann die Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen erheblich gesteigert werden[32]. Interessanterweise scheint auch im peripheren Blut noch eine begrenzte Rezeptorveränderung möglich zu sein, wofür der Nachweis von B-Gedächtniszellen mit RAG1/2-Expression, die bereits den Klassenwechsel hinter sich haben, Anhalt gibt [67]. Der Klassenwechsel ("Isotyp-Switch") stellt praktisch das finale genetische Rearrangement dar, bei dem es in der Regel durch ein "Looping-out" von zwischenliegenden C-Genen zu einer Veränderung des Isotyps kommt [68]. Die ursprüngliche VDJ- Region bleibt dabei unverändert. Inwieweit somatische Mutationen nach dem Klassenwechsel fortschreiten wird z.Z. noch kontrovers diskutiert. Zan et al.[69] zeigten an einer B-Zell-Studie in vitro, daß man auch nach dem "Switch" weitere Mutationen mit entsprechenden Stimuli induzieren kann.

Die Mehrheit der B-Zell-Tumoren hat mutierte V-Gene. Das unterschiedliche Ausmaß an somatischen Mutationen gibt dabei Informationen über den Differenzierungsstatus der Tumorzelle, ihre mögliche Vorläuferzelle innerhalb der B-Zell-Ontogenese und ihre Klonalität. So kann bei der CLL der Klon entweder mutierte oder nicht mutierte V-Gene aufweisen. Dies spricht dafür, daß der Zeitpunkt der malignen Transformation in unterschiedlichen Stadien der Zell-Differenzierung stattgefunden hat. Interessanterweise geht dieser Befund auch mit unterschiedlichem klinischen Verhalten des jeweiligen Klons einher, dessen genetische Eigenschaften nach dem Transformationsereignis intraklonal konstant bleiben[70;71]. Auch beim multiplen Myelom sind die V-Gene hochgradig mutiert, weshalb man als Ursprungszelle der Erkrankung einen Post-Keimzentrums-B-Lymphozyten vermutet, der durch den klonalen Antigenselektionsprozess beeinflußt worden ist. Die CDR-Regionen weisen dabei ein deutlich höhreres R:S-Muationsverhältnis auf als die FRW-Regionen [72-74]. Dennoch geht man nicht davon aus, daß ein Antigen den Krankheitsprozess unterhält oder sogar fördert, da die

Plasmazelle keine Zelloberflächenantikörper besitzt [75]. Die VH- Gene weisen mehr Mutationen auf als VL-Gene, ähnlich den Verhältnissen in normalen B-Zellen[66]. Eine Gemeinsamkeit der V-Gene beim MM ist das komplette Fehlen intraklonaler Variationen, vergleichbar einem "neoplastischen Arrest" [66;72-74;76-78], was ebenfalls auf ein spät in der B-Zell-Entwicklung gelegenes malignes Transformationsereignis hindeutet. Der genaue Zeitpunkt ist unklar. Interessanterweise koexistieren bei Myelomen nach Klassenwechsel in wenigen Fällen Cµ-positive Sequenzen mit dem gleichen tumorspezifischen CDR3-Rearrangement [79]. Welche Rolle diese vermutlich IgM-positiven B-Zellen, die mit dem Tumor offensichtlich in klonaler Beziehung stehen [80], für die Erkrankung an sich spielen ist ebenfalls nicht geklärt. Bei eher benignen Plasmazelltumoren wie der MGUS läßt sich dagegen intraklonale Heterogenität nachweisen [81]. Die Häufigkeit, mit der die einzelnen VH-Familien am VDJ-Rearrangement in peripheren B-Lymphozyten beteiligt sind, korreliert in etwa mit den Schätzungen der Größe der einzelnen Familien mit Hilfe von Southern Blot- und PCR-Analysen [50;82]. Bei B-Zell-Tumoren zeichnet sich ein eher eingeschränktes Repertoir an verwendeten VH-Genen ab. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit die bevorzugte Verwendung bestimmter VH-Gene Aufschluß geben kann über die mögliche Tumorgenese und ob möglicherweise die Stimulation durch bestimmte Antigene daran beteiligt ist. Antigene, die direkt über die FWR-Regionen binden, könnten als B-Zell-Superantigene die Expression bestimmter V-Gene auslösen [83], wie es beim Staphylokokken-Protein A der Fall ist. Hier dominiert die VH-3-Familie [84]. Ein weiteres Beispiel stellt die Kälteagglutininkrankheit dar, bei der die monoklonalen IgM-Paraproteine in ihren schweren Ketten ausnahmslos das VH4-34Gen aufweisen [85]. Auffälligerweise wird gerade dieses Gen beim multiplen Myelom nicht verwendet [86], obwohl es sogar in normalen B-Zellen mit einer Häufigkeit von 5-10% vertreten ist [87;88] und bei bestimmten Erkrankungen stark gehäuft verwendet wird (Diffuse large cell lymphoma: 65%(!); Hsu, 1995). Andere VH-Gene sind deutlich überrepräsentiert wie VH1-69, VH3-9, VH3-23 und VH3-30[86].

1.6.2 Die CDR3-Region

Die Antigenbindungsstelle eines Immunglobulins wird durch die sechs hypervariablen Regionen determiniert, die durch das V(D)J-Rearrangement der leichten und schweren Ketten bestimmt werden. Charakteristischerweise weisen dabei die CDRs, die in die FWR-Regionen 1-3 quasi eingebettet sind, deutlich mehr R-Mutationen auf als die FWRs[74]. Da diese R-Mutationen jeweils einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, kommt ihnen beim Vorgang der "Affinitätsreifung" (s.o.) des jeweiligen B-Zell-Klons eine zentrale Bedeutung zu[89]. Die CDR3-Region ist aufgrund ihres Bildungsmechanismus durch besondere Variabilität gekennzeichnet. Während die CDR1/2- Domänen durch das jeweilige V-Gen kodiert werden, bilden zur Rekombination der dritten hypervariablen Domäne zwei weitere Gensegmente die Grundlage, die D- und J-Segmente. Zusätzlich sorgt die Aktivität der TdT durch Insertion von N –Nukleotiden (s.o.) für weitere Sequenzvariation.

Die D-Region besteht aus 26 D-Segmenten innerhalb von 39kb DNA, 53 bzw.14 kb strangaufwärts der Jh-Segmente. Ähnlich der Vh-Familien lassen sich die D-Segmente in sechs Familien gruppieren, die hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenzen innerhalb einer Familie einen hohen Homologiegrad aufweisen, zwischen den Familien aber sehr verschieden sind. Vier Kopien von 9 kb Länge enthalten jeweils eine Kombination von D-Familien-Segmenten in der Reihenfolge 5`-D(M)-D(LR)-D(XP)-D(A)-D(K)-D(N)-3` [40;63;90;91]. Ein weiteres D-Segment (D(Q52)) liegt in der JH-Region[53], welches beim MM ebenfalls verwendet wird. Insgesamt finden sich also 27 D-Segmente, davon 25 funktionelle und zwei Pseudogene[91]. Bei der Verwendung der D-Segmente kommt es zu einer weiteren Besonderheit: sie können in drei verschiedenen Leserastern gelesen werden [42], was die Möglichkeit abortiver Rearrangements verringert. Die Analyse von D- Leserastern beim MM zeigt eine statistische Häufung des RF2 (reading frame 2). Desweiteren werden D-Segment-Duplikationen sowie Deletionen und Inversionen beobachtet[63;92].

Über den präferentiellen Gebrauch bestimmter JH-Gene ist bisher beim MM kaum etwas veröffentlicht worden. Bei der B-ALL findet sich dagegen ein extremes Überwiegen von JH4,5 und 6, die zu nahezu 90% der JH-Segmente stellen[93].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das V-N-D-N-(D-N)-J-Rearrangement der schweren Kette eines Immunglobulins ein für den jeweiligen Tumorklon hochspezifisches Merkmal darstellt.

1.7 Minimale Residualerkrankung (MRD) beim multiplen Myelom

Falls ein Patient an einer Leukämie, einem Lymphom oder einem soliden Tumor erkrankt ist, beschreibt man seinen Zustand dann als "komplette klinische Remission", wenn mit konventionellen klinischen, radiologischen, zytologischen und histologischen Methoden die maligne Grunderkrankung nicht mehr nachgewiesen werden kann. Gelingt es nun mit hochsensitiven immunologischen oder molekularbiologischen Methoden (wie der PCR) dennoch, Tumorzellen nachzuweisen, so bezeichnet man dies als "minimale Resterkrankung bzw. Residualerkrankung" (MRD) und hat den z.Z. niedrigst nachweisbaren Grad des Fortbestehens der Erkrankung dokumentiert.

Die *in vitro* Amplifikation von tumorspezifischer RNA/DNA mittels PCR ermöglicht den Nachweis sehr geringer Tumorzellzahlen (bis zu einer neoplastischen Zelle in 10⁶ normaler Zellen). Die Voraussetzung dafür ist allerdings, daß der Tumorzellklon einen für ihn hochspezifischen genetischen "Marker" im Sinne einer spezifischen RNA/DNA-Sequenz besitzt, die in jeder Tumorzelle konstant vorkommt. Beim multiplen Myelom findet man einen solchen spezifischen Marker in Form des monoklonalen IgH-Rearrangements des Tumorklons.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Verfahren dazu verwendet, im peripheren Blut oder in Stammzelltransplantaten von MM-Patienten Tumorzellen nachzuweisen und zu quantifizieren. Dabei kamen immunzytochemische[94] oder molekularbiologische[95-97] Methoden zum Einsatz, bei denen jedoch die akkurate Quantifizierung problematisch war. 1992 veröffentlichten Brisco& Sykes einen PCR-Ansatz, der auf einer IgH-CDR3-PCR und Verdünnungsreihen zur Quantifizierung beruhte und immer weiter verbessert wurde[98]. Auch Southern-Blot-Hybridisierungen dienten der Quantifizierung [95], deren Genauigkeit aber sehr eingeschränkt war. Später wurden die Ansätze durch Untersuchungen an bestimmten Zellsubpopulationen erweitert[99;100] und Aufreinigungsmethoden für Stammzelltransplantate mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ("Purging") etabliert und evaluiert[101-103]. Desweiteren konnten auch im peripheren Blut monoklonale Plasmazellpopulationen nachgewiesen werden[94;95;104], die schlechter als die Tumorzellen im Knochenmark auf Chemotherapie ansprechen[105] und sich auch in Stammzellapherisaten aus dem peripheren Blut wiederfinden[106]. Da man die kontaminierenden Tumorzellen als potentiellen Grund für einen frühzeitigen Rückfall nach autologer Transplantation betrachtet, wird kontrovers diskutiert, ob die Aufreinigung von

Stammzelltransplantaten einen wesentlichen Einfluß auf das klinische Ergebnis hat[99;101]. Inzwischen wurde das Monitoring residualer Tumorzellen mit real-time-PCR auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation angewandt und es zeigte sich, das man aus MRD-Analysen wichtige Informationen über den Verlauf der Erkrankung gewinnen und potentiell zur Steuerung der Immunsuppression nach Transplantation nutzen kann[107].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es für MRD-Analysen besonders bei der Durchführung neuer Therapieansätze beim multiplen Myeloms vielfältige Anwendungsmöglichkeiten gibt und sich hierdurch neue Informationen über den Verlauf und das Verhalten der Erkrankung gewinnen lassen.

1.8 Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit soll versucht werden, eine geeignete PCR-Strategie zu finden, die bei möglichst vielen Patienten mit multiplem Myelom den Nachweis des klonspezifischen IgH-Rearrangements ermöglicht. Nach der Sequenzierung des IgH-Rearrangements und nach der Synthese klonspezifischer Primer soll eine quantitative real-time-PCR zum hochspezifischen und -sensitiven quantitativen Nachweis von Tumorzellen in Blut- und Knochenmarkproben etabliert werden. Mit Hilfe dieser PCR ist es unser Ziel, die minimale Resterkrankung bei Patienten mit multiplem Myelom quantitativ im Krankheitsverlauf zu verfolgen.

2. Materialien

2.1 Geräte

#	PCR-Geräte
11	- Thermocycler, 2400, 9700 (PE Biosystems, 64331 Weiterstadt)
	Sequence Detection System SDS 7700 (DE Dissystems, 64221 Weiterstadt)
	- Sequence Detection System SDS 7700 (PE Biosystems, 04551 weiterstaat)
#	Sequenziereineiheit: SDS ABI PRISM 310 (PE Biosystems 64331 Weiterstadt)
#	6700 Automated Nucleic Acid Work Station (ABI PRISM, Applied Biosystems)
#	Aufreinigungssäulen
	-Ultrafree® DNA, Millipore (Amicon® Bioseparations)
	-YM-100, Millipore (Amicon® Bioseparations)
	-Centrisep (Princeton Separations)
#	Elektrophoreseeinheit:
	-Elektrophoresekammern (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
	- Gleichspannungsgeräte (Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg)
#	Photoeinheit:
	-UV-Transilluminator (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, D-72770 Reutlingen)
	-GelDoc 2000 System (Biorad Laboratories GmbH, Hercules, 94547 CA, USA)
#	Spektrophotometer: UltroSpec3 (Pharmacia Biotech GmbH, D-79111 Freiburg)
#	Zentrifugen:
	-Tischkühlzentrifuge (Eppendorf, D-22313 Hamburg)
	-Vakuumzentrifuge (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, D-72770 Reutlingen)
	-Zentrifugen mit variabler Temperatureinstellung: Varifuge 1.0, Varifuge 3.0RS (Haereus
	Instruments, D-63405 Hanau)
#	Heizblock und Wasserbad:
	-elektronischer Heizblock (Gebrüder Liebisch GmbH, D-33649 Bielefeld)
	-Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30927 Burgwedel)
#	Überkopfschüttler (Gesellschaft für Labortechnik mbH, D-30927 Burgwedel)
#	Sicherheitswerkbank: Hera safe (Heraeus instruments)
#	Zellsieb: Zellsieb steril 70 µm (Falcon, USA)

#	Zählkammer:	Neubauer "improved"; Tiefe 0,100mm; 0,0025mm ²
		(Brand, Germany)
#	Pipetten:	Mikropipetten mit variablen Volumina 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl
		(Gilson Medical Elektronics, F-95400 Villiers-le-Bel, France)

Weitere verwendete Materialien werden bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.2 Chemikalien/Reagenzien

- # Taqman PCR Core Reagent Kit with AmpliTaq GoldTM
 (PE Biosystems, D-64311 Weiterstadt)
- # Sequenzierreagenzien: Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems)
- # Elektrophorese Reagenzien:
 - -100 bp Längenmarker der Firma Invitrogen
 - Fertiggele
- # Reagenzien zur Präparation von PBMNC:
 - -Dulbecco-PBS-Puffer (Biochrom KG Seromed)
 - -Ficoll Paque (Dichte 1.077 ± 0.0001 g/ml; Pharmacia, Freiburg)
 - -Essigsäure (Merck, Darmstadt)
 - -EDTA (Ethylendiamintetraacetat; Sigma)
 - -Methylenblau (Sigma)
- # Reagenzien für die Präparation von DNA:
 - -DNA Cell Lysis Solution Kit (Gentra Systems, Minneapolis)
 - -Ethanol (J.T. Baker BV, Deventer; Holland bzw. Merck, Darmstadt)
 - -Isopropanol (Merck)
 - -Ampuwa (steriles Aqua ad iniectabilia, Fresenius, Bad Homburg)
- # Reagenzien für die Präparation von RNA:
 - mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch Gladbach)
- # cDNA-Synthese: Taq Man Gold RT-PCR-KIT (Applied Biosystems)

Weitere Chemikalien wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82041 Deisenhofen geliefert und sind unter den einzelnen Methoden aufgeführt.

2.3 Enzyme

- # Ampli-Taq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, D-64311 Weiterstadt)
- # Reverse Transkriptase (MMLV), Applied Biosystems

2.4 Oligonukleotide

PCR-spezifische, fluoreszenz-markierte, einzelsträngige DNA-Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems (D-64331 Weiterstadt) hergestellt. Weitere DNA-Sonden (MGB-Sonden) und Oligonukleotide wurden bei der Firma Applied Biosystems UK. (Warrington, Cheshire) in Auftrag gegeben.

Die Oligonukleotidlösungen der Primer für die PCR wurden auf eine Konzentration von 20 pmol/µl eingestellt. Alle Oligonukleotidlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Auswahl der Oligonukleotidprimer erfolgte mit Hilfe der Software PrimerExpress 1.0, Dnasis 2.6. (Hitachi) und Oligo 6 (s. 3.8).

Folgende Primer und Sonden wurden verwendet:

V_H-Leader-Primer

V _H 1-L Primer	5' - CAT GGA CTG GAC CTG GAG - 3'
V _H 2-L Primer	5' - GGA CAT ACT TTG TTC CAC GC - 3'
V _H 3-L Primer	5' - ATG GAG TTT GGG CTG AGC T - 3'
V _H 4-L Primer	5' - ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT - 3'
V _H 5-L Primer	5' - GGG GTC AAC CGC CAT CCT - 3'
V _H 6-L Primer	5' - GTC TGT CTC CTT CTT CAT CTT C - 3'
VH1-Leader-r	5' - CCATGGACTGGACCTGGAGG - 3'
VH2-Leader-r	5' - ATGGACATACTTTGTTCCAC - 3'
VH3-Leader-r	5' - CCATGGAGTTTGGGCTGAGC - 3'
VH4-Leader-r	5' - ATGAAACACCTGTGGTTCTT - 3'
VH5-Leader-r	5' - ATGGGGTCAACCGCCATCCT - 3'
VH6-Leader-r	5' - ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT - 3'
VH C gamma-r	5' - GGGAAGACCGATGGGCCCTT - 3'
J _H Consensus Prin	ner 5' - ACC TGA GGA GAC GGT GAC- 3'
VH C gamma	5' - AGGG(T/C)GCCAGGGGGAAGA - 3'

V_H-FR3-Primer

V _H 1-FR3-Primer	5' - CAC AGA AGT TCC AGG GCA G - 3'
V _H 2-FR3-Primer	5' - CAG GCT CAC CAT CTC CAA - 3'
V _H 3-FR3-Primer	5' - TTC ACC ATC TCC AGA GAC AA - 3'
V _H 4-FR3-Primer	5' - CAA CCC GTC CCT CAA GAG TC - 3'
V _H 5-FR3-Primer	5' - TAC AGC CCG TCC TTC CAA G - 3'
V _H 6-FR3-Primer	5' - ATT ATG CAG TAT CTG TGA AAA GT - 3'

Primer für Gene-Scan

$V_{\rm H}$ 1-FR3-Primer 5'- FAM	I - CAC AGA AGT TCC AGG GCA G - 3'
$V_{\rm H}$ 2-FR3-Primer 5' - HE 2	X - CAG GCT CAC CAT CTC CAA - 3'
$V_{\rm H}$ 3-FR3-Primer 5' - NEI	D - TTC ACC ATC TCC AGA GAC AA - 3'
$V_{\rm H}$ 4-FR3-Primer 5' - FAN	A - CAA CCC GTC CCT CAA GAG TC - 3'
$V_{\rm H}$ 5-FR3-Primer 5' - HE 2	X - TAC AGC CCG TCC TTC CAA G - 3'
$V_{\rm H}$ 6-FR3-Primer 5' - NEI	D - ATT ATG CAG TAT CTG TGA AAA GT - 3'
JH-Consensus 5' - NEI	D - ACCTGAGGAGACGGTGAC - 3'

K-ras-Standard

K-ras 5' Primer	5' - CTT GTG GTA GTT GGA GCT - 3'
K-ras 3' Primer	5' - ATC AAA GAA TGG TCC TGC - 3'

PBGD

PBGD 5' Primer	5' - GTCTGGTAACGGCAATGCG - 3'
PBGD 3' Primer	5' - TCTGTATGCGAGCAAGCTGG - 3'

Primer für die Sequenzierung

Die V_H -FR3- und V_H -Leader-Primer wurden für die Sequenzierungsreaktion um eine BAM HI-Schnittstelle (GGATCC) und um 1-3 weitere Basen 5' verlängert. Der J_H-Consensus-Primer wurde um eine HindIII-Schnittstelle (AAGCTT) verlängert.

V_H-FR3-Primer für die Sequenzierung

V _H 1-BAM Primer	5' - <u>CGA TGG ATC</u> C <i>CA CAG AAG TTC CAG GGC AG</i> - 3'
V _H 2-BAM Primer	5' - <u>TGG ATC C</u> CA GGC TCA CCA TCT CCA A- 3'
V _H 3-BAM Primer	5' - <u>TGG ATC C </u> <i>TT CAC CAT CTC CAG AGA CAA</i> - 3'
V _H 4-BAM Primer	5' - <u>CGA TGG ATC</u> C <i>CA ACC CGT CCC TCA AGA GTC</i> - 3'
V _H 5-BAM Primer	5' - <u>CGA TGG ATC</u> C <i>TA CAG CCC GTC CTT CCA AG</i> - 3'
V _H 6-BAM Primer	5' - <u>GAT CC A</u> TTA TGC AGT ATC TGT GAA AAG T - 3'

HindIII-J_H-Consensus-Primer 5' - <u>GTA AGC TT</u> ACC TGA GGA GAC GGT GAC- 3'

$\mathbf{V}_{\mathrm{H}}\text{-}\mathbf{Leader}\text{-}\mathbf{Primer}$ für die Sequenzierung

BAM-V _H 1-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC C</u> AT GGA CTG GAC CTG GAG - 3'
BAM-V _H 2-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC</u> GGA CAT ACT TTG TTC CAC GC - 3'
BAM-V _H 3-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC C</u> CA TGG AGT TTG GGC TGA GC - 3'
BAM-V _H 4-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC</u> <i>ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT</i> - 3'
BAM-V _H 5-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC</u> <i>GGG GTC AAC CGC CAT CC T</i> - 3'
BAM-V _H 6-L-Primer	5' - CGA T <u>GG ATC</u> <i>GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT C</i> - 3'

Sonden für die quantitative real-time PCR

$V_{H}1$	5' - FAM - ACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT - TAMRA - 3'
$V_{\rm H}^2$	5' - VIC - TGACCAACATGGACCCTGTGGACA - TAMRA - 3'
$V_{\rm H}3$	5' - FAM - AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG - TAMRA - 3'
$V_{H}4$	5' - FAM - ACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGT - TAMRA - 3'
$V_{\rm H}5$	5' - VIC - TACCTGAAGTGGAGCAGCCTGAAGG - TAMRA - 3'
$V_{H}6$	5' - VIC - CGAATAACCATCAACCCAGACACA - TAMRA - 3'

K-ras 5' - FAM - AAG AGT GCC TTG ACG ATA CAG C - TAMRA - 3'

PBGD 5' - VIC - TGCAACGGCGGAAGAAACA - TAMRA- 3'

MGB-Sonden

VH1 germl 1 : 5' - FAM- TCAGGCTGC	FCAGCTC
VH3 germl 21 : 5' - FAM- CAGCCGTGTG	CCTCG
VH1 L.B. spez. : 5' - FAM- TCAGGCT	GCTCAGGTC

2.5 Software

Die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms Dnasis 2.6 (Hitachi), den Genbanken EMBL (European Molekular Biology Laboratory) und "Igblast - Blast for Nucleotide Sequences" (<u>www.ucbi.ulm.uih.gov/igblast/</u>) des "National Center for Biotechnology Information" (NCBF) durchgeführt. Die Auswahl der PCR Primer und Sonden erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware Oligo 6 (National Biosciences Inc., Plymouth, MN, USA) und Primerexpress 1.0 (Applied Biosystem). Die Auswertung der PCR Ergebnisse erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) und Quatro Pro 8.0 (Corel). Die mit GelDoc 2000 aufgenommenen Elektrophoresegele wurden mit der Software Quantity One (BioRad, Hercules, USA) ausgewertet. Die vorliegende Arbeit entstand mit Hilfe der Programme Corel Word Perfect 2002 (Corel Deutschland, Unterschleissheim) und Corel Draw 9.0 (Corel Deutschland, Unterschleissheim).

2.6 Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Ausgangsmaterial für die Untersuchungen waren bei -80°C tiefgefrorene, mononukleäre Zellen, die über einen Ficollgradienten (Zentrifugation) aus peripherem Blut und Knochenmark isoliert worden waren. Die Zellen stammten von Patienten der Universitätskliniken Freiburg und Greifswald. Für die Identifizierung des VDJ-Rearrangements des malignen Zellklons wurden Knochenmarkaspirate von Patienten mit multiplen Myelom verwendet, die möglichst bei Erstdiagnose vor jeglicher Therapie gewonnen wurden und mehr als 10% Plasmazellen aufwiesen. Die Zusammensetzung der in der Arbeit untersuchten Patienten je nach Paraprotein wird in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Myelom-Typ	Anzahl Patienten
IgG	20
IgA	1
Leichtketten	4
asekretorisch	1

3. Methoden

3.1 Präparation zellulärer DNA

Zur Präparation zellulärer DNA aus mononukleären Zellen von Knochenmark und Blut wurde der PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mittels dieser Methode konnte qualitativ hochwertige, d.h. hochmolekulare DNA gewonnen werden, deren Quantifizierung durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte erfolgte.

3.2 Präparation von zellulärer mRNA

Die Präparation von RNA erfolgte mit dem mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers.

3.3 Synthese von cDNA

Zur cDNA-Synthese wurde der Taqman Gold RT-PCR Kit verwendet.

Substanzen	Menge
RT Puffer	2 µl
Mg(Cl)2	5,1 µl
dNTP	4 µl
Oligo (dt) Primer	1 µl
RNAse-Inhibitor	0,4 µl
MMLV Reverse Transkriptase	0,5 µl
Probenmaterial (RNA)	7 µl
Total	20 µl

Reaktionsbedingungen:

Zeit	Temperatur
10 min	25°C
120 min	37°C
5 min	95°C

Die fertige cDNA wurde dann bei -20°C eingefroren.

3.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.4.1 Funktionsweise der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine erstmals 1985 beschriebene Methode, bei der durch in vitro- Amplifikation einer spezifischen DNA-Zielsequenz mittels zweier Oligonukleotide (Primer) und eines Enzyms (DNA-Polymerase) in einer prinzipiell dreiteiligen Reaktion mit einer variablen Anzahl von Zyklen ein bestimmter DNA-Abschnitt exponentiell vervielfacht wird. Die Länge der Zielsequenz wird dabei durch die Wahl der Oligonukleotide determiniert, die mit je einem der hitzedenaturierten Einzelstränge antiparallel zueinander an dessen 5'- Ende hybridisieren (d.h., die 3'- Enden der Primer sind einander zugewandt). Im ersten Reaktionsschritt werden DNA, Oligonukleotide und DNA-Polymerase gemischt und die DNA thermisch denaturiert ("Melting": Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der Komplementärstränge). An die beiden DNA-Einzelstränge können sich im zweiten Reaktionsschritt die beiden Primer komplementär ihrer Sequenz binden ("Annealing"). An den freien 3'-Enden der Primer findet die DNA-Polymerase im dritten Reaktionsschritt ihren Replikationsstartpunkt und synthetisiert nun den Komplementärstrang (Primer-"Extension"). Nach der nächsten Hitzedenaturierung fungiert das Syntheseprodunkt des einen Primers praktisch dem anderen als Ziel, was theoretisch zu einer Verdopplung der DNA-Fragmente nach jedem Zyklus führt. So kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

3.4.2 Quantitative "real-time"- PCR

Um die Analyse des PCR-Amplifikates möglichst kontaminationsfrei und automatisiert durchführen zu können war es nötig, ein Testsystem zu entwickeln, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des Produktes simultan ohne Öffnung des Reaktionsgefäßes erfolgen kann. Holland et al.[108] stellten 1991 einen neuen PCR-Ansatz vor, bei dem die 5`-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase zum Nachweis der sequenzspezifischen Amplifikation ausgenutzt wird. Während der Synthese des komplementären DNA-Stranges spaltet die Taq Polymerase bereits an den Strang gebundene fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide ab. Die Sonden bestehen aus einem Reporterfluoreszenzfarbstoff (Fluoreszeinderivat, z.B. FAM) am 5`-Ende und einen sogenannten Quencher-Farbstoff (Rhodaminderivat, z.B. TAMRA) am 3`-Ende. Der Quencher wird zusätzlich an seinem 3`Ende durch einen Phosphatrest blockiert. Solange die zweifach markierte Sonde intakt ist, wird bei Anregung durch eine spezifische Wellenlänge (488nm) eine Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch den Fluoreszenz-Energietransfer (FET), unterdrückt[109]. Wird die an den Matrizenstrang zwischen die beiden Primer spezifisch hybridisierte Sonde jedoch durch die 5`-3`- Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase hydrolysiert, kommt es zur Freisetzung der Reportermoleküle und ein FET ist nicht mehr möglich. Die Stärke des meßbaren Fluoreszenzsignals steht mit der Menge des PCR-Produktes in stöchiometrischer Beziehung, da mit jedem synthetisierten DNA-Strang ein Reportermolekül freigesetzt wird. Diese Änderung der Fluoreszenz kann mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus ("Echtzeit") erfaßt werden. Die Sequenzspezifität des Signals wird durch die Spezifität der eingesetzten Sonde sichergestellt (sequenzspezifische Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz). Da die Intensität der Fluoreszenz der Menge der amplifizierten DNA direkt proportional ist, kann die Anzahl der am Beginn der Reaktion vorhandenen Kopien erkannt werden.



Abb. 3.1: Das TaqMan[®] PCR-Testsystem: Fluorogene DNA-Sonden (TaqMan[®]-Sonden), die am 5' Ende mit einem Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff (Fluoreszeinderivat, z.B. FAM) und am 3' Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodaminderivat, z.B. TAMRA) markiert sind, hybridisieren an die DNA-Zielsequenz. Durch die hydrolytische Aktivität der Taq-DNA-Polymerase wird der Reporter (R - rot) vom Quencher (Q - grün) abgespalten, wodurch die Reporterfluoreszenz nicht mehr auf den Quencher übertragen werden kann. Der konsekutive Anstieg des Reportersignals mit jedem weiteren PCR-Zyklus wird mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detektor gemessen.

Mit Verdünnungsreihen und stochastischen Untersuchungen lassen sich für jede spezifische PCR Standardkurven bestimmen, die bei gleicher PCR-Effizienz jedem Threshold cycle (C_T) eine bestimmte Ausgangskopienzahl des gesuchten Gens zuweisen.

3.4.3 Kontaminationsvermeidung bei PCR-Untersuchungen

Bei Einsatz von PCR-Untersuchungen, besonders zur Diagnostik und Verlaufskontrolle, haben Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen einen äußerst hohen Stellenwert. Insbesondere der "Carry-over" von DNA stellt eine Gefahr dar[110], da bereits wenige DNA-Moleküle bei den verwendeten hochsensitiven Ansätzen genügen, ein falsch positives Ergebnis zu erzeugen. Mit dem Gebrauch von UTP statt TTP als Nukleotid im PCR-Ansatz und der Verwendung von UNG (Uracil-N-Glykosilase) konnte dieses Problem weitgehend gelöst werden, da vor dem Start der PCR die UNG kontaminierende, früher amplifizierte DNA dort spaltet, wo

Uracil statt Thymin eingebaut ist[111]. Hierzu geht dem PCR-Zyklus ein zwei-minütiger Inkubationsschritt bei 50°C voraus. Im folgenden Reaktionsschritt, dem sogenannten "chemical hot start", wird die UNG inaktiviert, während eine durch Hitze aktivierbare Enzymvariante der Taq-Polymerase durch den 10min bei 95°C dauernden Zyklus erst aktiviert wird. Weitere Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung waren:

- vor Arbeitsbeginn jedesmal Reinigung des Arbeitstisches mit 0,1M Natronlauge und Verwendung von Arbeitsunterlagen
- PCR-Ansätze und verwendete Substanzen wurden in einem Raum pipettiert; Zugabe der DNA erfolgte streng getrennt in einem anderen Raum
- Primer, dNTP etc. wurden aliquotiert
- Einmal geöffnete H2O-Portionen wurden nach Verwendung verworfen.
- Es wurden sterile Einmalpipettenspitzen und sterile Reaktionsgefäße verwendet. Die Reaktionsgefäße waren leicht zu öffnen, um die Freisetzung von DNA durch Spritzer zu vermeiden.
- Bei jeder PCR wurden Negativkontrollen mitgeführt.
- Die Arbeitshandschuhe wurden häufig gewechselt.

3.5 Auswahl der Primer und Sonden

Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von Literaturangaben und durch Homologievergleiche von Genbankdaten erstellten Sequenzen[40]. Die Sequenzen der selbst generierten Primer[112] wurden, um unerwünschte Homologien und damit unspezifische PCR-Amplifikate zu vermeiden, nochmals mit Fremdsequenzen bzw. mit der gesamten Genbank (Gen Bank-EMBL, NCBF) abgeglichen.

3.6 Bestimmung der Anzahl der untersuchten Zellen

Soll ein bestimmtes Zielgen in einer unbekannten Probe quantitativ nachgewiesen werden, so ist zusätzlich eine quantitative Analyse eines Referenzgens zur Bestimmung der Anzahl der untersuchten Zellen notwendig. Geeignete Verdünnungsstufen wurden als Aliquots bei -20°C gelagert und als quantitative externe Standards in der quantitativen "real-time" PCR eingesetzt.

Die Etablierung der Standardkurven für das klonierte k-ras DNA-Fragment und hochmolekulare zelluläre DNA wurden in Vorarbeit von Mitarbeitern und Arbeitsgruppen durchgeführt[113].

3.7 Durchführung der PCR

3.7.1 PCR-Ansatz

Zur Herstellung des PCR-Ansatzes wurde der Taqman PCR Core Reagent Kit (PE Applied Biosystems) with Ampli Taq Gold verwendet.

Substanz	Stocklösung	eingesetzt	Konzentration
		Volumen	in 50 µl
Puffer A*	10x	5 µl	1 x
MgCl(2)	25 mM	8 µl	4 mM
Primer 1 (sense)	20 µМ	1 µl	400 nM
Primer 2 (antisense)	20 µМ	1 µl	400 nM
fluorogene Sonde	2 μΜ	5 µl	200nM
dATP, dGTP, dCTP	10 mM	je 1 µl	200 µM
dUTP	20 mM	1 µl	400 μΜ
Uracil-N-Glycosilase (UNG)	1 U/µl	0,5 µl	0,025 U/µl
AmpliTaq Gold TM	5 U/µl	0,3 µl	0,01 U/µ1
H(2)O		15,2 µl	
Total (Master Mix)		40 µ l (+ 10 µl	
		DNA)	

Tab.3.1: Zusammensetzung des "Master Mix"

*: Puffer A: 50 mM KCl

10 mM Tris-HCl, pH 8,3

60 nM ROX (6-carboxy-x-rhodamine = passiver Referenz-farbstoff)

Zu den 40µl/PCR-Mixtur wurden 10µl DNA (75ng/µl) zupipettiert, so daß das Gesamtvolumen 50 µl/Reaktionsansatz betrug. Alle Experimente wurden mit dem ABI PRISM SDS 7700 Sequence Detection System durchgeführt.

3.7.2 Reaktionsbedingungen der PCR

Es	wurden	folgende	Reaktionbedingungen	gewählt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer des	Anzahl der
	(°C)	Zyklus (min)	Zyklen
1	50	2	1
2	95	10	1
3a	95	0,25	55
3b	61	1	
4	72	10	1
5	4	Х	Х

Tab.3.2: Temperatur-Zeit-Protokoll der PCR

3.8 Agarosegelelektrophorese

Im elektrischen Feld ist die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten auf Grund des konstanten Masse/Ladungsverhältnisses proportional zum Molekulargewicht, was eine Auftrennung nach Größe ermöglicht. Zur Größenbestimmung wurde ein Standard (Längenmarker 100-1000bp-Fragmente, Invitrogen) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit GelDoc 2000-Gerätesystem und mit der Software Quantity One.

3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger mit dem Big Dye Kit (PE Applied Biosystems) am PRISM 310 (PE Biosystems 64331 Weiterstadt).
3.9.1 Aufbereitung der DNA-Probe zur Sequenzierung

Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Elektrophoresegel mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten. Zur Entfernung der Agarose und Aufreinigung der DNA wurden die herausgeschnittenen Banden auf eine Ultrafree® Millipore Säule (Amicon® Bioseparations) gegeben und zentrifugiert. Die DNA wurde reamplifiziert, um eine größere Menge an spezifischem PCR-Produkt für die Sequenzierreaktion zur Verfügung zu haben. Über eine Kontrollelektrophorese wurde schließlich die Länge des reamplifizierten Fragmentes überprüft. Nur wenn sich eine klare Bande der erwarteten Länge zeigte, wurden die Reamplifikate über YM-100 Säulen (Millipore, Amicon® Bioseparations) aufgereinigt.

3.9.2 Sequenzierreaktion

Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurde nun in den Sequenzieransatz eingesetzt. Hierfür wurde der Big Dye Terminator Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) verwendet.

Reaktionsansatz:

Substanz	Volumen
Premix	8µ1
Primer (20 µM)	0,5µl
DNA	11µl
Total	20µl

Es erfolgte jeweils ein Ansatz für den 3'Primer und den 5'-Primer (HindIII- J_{H-} , VHc γ -, BAM- V_{H} -FR3- bzw. BAM- V_{H} -Leader-Primer).

Reaktionsbedingungen:

Zeit	Temperatur	Anzahl der
(sec)	(°C)	Zyklen
10sec	96	1
5sec	50	25
160	60	

Das Reaktionsprodukt (20µl) wurde nun über eine "Centri SEP Spin Column" (Princeton Separations Adelphia, NJ, USA) aufgereinigt. Danach wurde der Ansatz in einer Vakuumzentrifuge (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) getrocknet und in 20µl Formamid aufgenommen und dann 2min bei 95°C denaturiert. Die Proben konnten jetzt durch den ABI PRISM Sequence Analyser 310 analysiert werden.

3.9.3 Auswertung der Sequenzanalysen

Die mit dem ABI PRISM Sequence Analyser 310 erfaßten Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Dnasis 2.6 (Hitachi) ausgewertet. Durch Homologievergleich mit der Gen-Datenbank "Igblast - Blast for Nucleotide Sequences" konnte das Genrearrangement genau nach den verwendeten V-, D- und J-Genen sowie den dazwischen liegenden N–Segmenten (CDRIII-Region) analysiert werden.

3.10 Quantitative Verlaufskontrollen an peripheren Blut- und Knochenmarkproben von Patienten mit multiplem Myelom

Aus der IgH-CDR3-Region des Myelomzellklons wurde ein Klon-spezifischer-3'-Primer ausgewählt. Die Spezifität der Klon-spezifischen PCR wurde in PCR-Tests mit Proben des betreffenden Patienten sowie mit fünf Negativkontrollen mit DNA-Proben aus Blut von gesunden Probanden überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 PCR-Ansätze und Identifikation des Myelomklons

Um den malignen Zellklon nachweisen zu können wurden im Verlauf der Experimente mit ausgewählten Patienten bis zu acht verschiedenen PCR-Ansätze ausgetestet. Die Ansätze unterscheiden sich in den verwendeten Nukleinsäuren (DNA/cDNA), in den Primerkombinationen und in den Reaktionsbedingungen (Temperatur).

PCR-Ansatz	Untersuchungs	Primer 1 (5')	Primer 2 (3')	Temperatur in
	material			°C
1	DNA	FR3	Jhcons	61°
2	DNA	Leader	Jhcons	61°
3	DNA	FR3	Jhcons	58°
4	DNA	Leader-r	Jhcons	61°
5	cDNA	FR3	Jhcons	61°
6	cDNA	Leader	Jhcons	61°
7	cDNA	FR3	Vhcgamma	61°
8	cDNA	Leader-r	Cgamma-r	61°
Gene-Scan	DNA	FR3	Jhcons	61°

Tabelle 4.1: PCR-Ansätze

Entsprechend den sechs VH-Familien kamen jeweils sechs 5'-Primer (FR3/Leader) und ein 3'-Primer, der entweder zum Jh-Segment oder zum C-Teil (nur cDNA) komplementär war, zum Einsatz. Insgesamt erbrachte keiner der acht PCR-Ansätz bessere Ergebnisse als die anderen erprobten Ansätze im Sinne einer signifikant häufigeren Bestimmung des malignen Zellklons. Entgegen den Erwartungen gilt dies auch für die Experimente mit Leader-Primern, bei denen der Primer in einer Region mit weniger Mutationen bindet.

Die Patienten zeigten im Vergleich der acht PCR-Ansätze ein individuelles Ergebnismuster, das von einer positiven VH-Familien-Bestimmung in allen Ansätzen bis zu keinem einzigen positiv getesteten Ansatz reichte (siehe Tabelle 3). Beim Patienten H.A. war nur in einem einzigen Ansatz die VH-Familien-Bestimmung möglich (das Ergebnis wurde zur Überprüfung zweimal reproduziert).

Patient	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5	Ansatz 6	Ansatz 7	Ansatz 8
1. L.B.	VH1	VH1	VH1	n.g.	VH1	VH1	VH1	VH1
2 . H.A.	X	X	X	Х	X	X	VH3	X
3. L.V.	X	X	X	Х	X	X	X	X

Tabelle 4.2: Drei Patientenbeispiele (X = negativ, n.g.= nicht getestet)

Nur in wenigen Fällen war es möglich, auf Grund des Ergebnisses der quantitativen real-time PCR direkt auf die verwendete VH-Familie schließen zu können, da die einzelnen VH-Familienspezifischen Signalanstiege (siehe Kurvenverläufe und Ct) nur geringfügige Unterschiede aufwiesen (siehe Abb.1/2). Aus diesem Grund wurden mit allen PCR-Amplifikaten (VH1-VH6) Gel-Elektrophoresen durchgeführt, um im Falle einer erfolgreichen Amplifikation eine spezifische DNA-Bande darstellen zu können (siehe Abb.3: Patientin L.B. mit VH1-Rearrangement). Die erwartete Fragmentgröße betrug zwischen 100-200 bp bei Verwendung von FR3-Primern und ca. 400 bp bei Leaderprimern.

Wenn mit DNA bereits die VH-Familienbestimmung eines Klons möglich war, so konnte mit dem Test der cDNA bei den Patienten, bei denen sowohl DNA als auch cDNA untersucht wurde, die gefundene VH-Familie in allen Fällen bestätigt werden.

Abb.4.1-6: Ergebnisse der primären "real-time" PCR (1, 2, 4, 5) zur Identifizierung der V_H -Gen-Familie des rearrangierten IgH-Locus eines malignen Myelomzellklons und elektrophoretische Analyse auf einem 2% Agarosegel (4.3/6)

Abb.4.1/2: Etwa gleich hoher Ct in allen sechs VH-Familien.

Abb.4.4/5: Niedriger Ct und hohes RV für VH3.



Tab. 4.3: Ct-Werte Patient L.B., Untersuchungsmaterial DNA

VH-Familie	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	kras
Ct-Wert	33,9	36,9	32,6	34,1	35,7	44,8	22,1



VH-Familie	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	kras
Ct-Wert	30,1	33,4	24,8	30	32,9	34,9	19,8

Tab.4 .4: Ct-Werte Patient F., Untersuchungsmaterial DNA

Myelom-	Anzahl	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH nicht
Тур								bestimmt
IgG/IgA	21	6	1	6	5	-	-	3
LK	4	1	-	1	-	-	-	2
asekret.	1	-	-	-	-	-	-	1
Total	26	7	1	7	5	-	_	6
in %		35%	5%	35%	25%	0	0	

Insgesamt konnte von 26 untersuchten Patienten bei 20 Patienten (20/26= 77%) ein VH-Rearrangement ermittelt werden.

Tabelle 4.5: VH-Familien-Verteilung im Rearrangement des IgH-Lokus beim multiplen Myelom

Die dargestellte VH-Familien-Verteilung zeigt eine deutliche Dominanz der Familien VH1, VH3 und VH4. Die VH-Familien 5 und 6 wurden nicht gefunden.

4.2 Zusätzliche Banden in der Elektrophorese

Wie in Abb.4.3 ebenfalls ersichtlich kann man teilweise zusätzliche, in mehreren VH-Familien vorhandene Banden erkennen (z.B. in Abb.4.3 Pos.6/VH5), die sich dann aber deutlich schwächer und unscharf abgrenzen oder mit falscher Bandengröße darstellen. Um diese unspezifischen, nicht neoplastischen Amplifikate einmal beispielhaft analysieren zu können bzw. um die geringe Auflösung der Elektrophorese zu umgehen wurde mit sechs Patienten ein Gene-Scan durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, daß sich bei erfolgreicher Amplifikation die distinkte VH-Familie des Tumorklons durch einen einzigen klaren monoklonalen Peak zeigt, während die in der Gel-Elektrophorese als unspezifisch beurteilten polyklonalen Banden aus einer Reihe von Fragmenten unterschiedlicher Größe bestehen (siehe Abb.4.7, Patient B.D., VH3).



VH3: Jeweils ein klarer Peak bei ca.160pb.

Abb.4.7 : Genescan Patient B.D.



Abb.4.8: Elektrophorese Patient B.D.

4.3 Sequenzierung und Analyse des VDJ-Rearrangements4.3.1 Analyse der VH-Gene

Die unter 3.9 beschriebene Sequenzierung und Sequenzanalyse wurde bei 18 Patientenproben angewendet und lieferte bei 17 Proben gute Ergebnisse. Bei einem Patienten gelang die Sequenzierung nicht. Die vorher in der primären PCR-Analyse und Agarosegelelektrophorese ermittelte VH-Familie der Tumorklone stimmte in allen Fällen mit den Sequenzanalysen überein. Die generierten Sequenzen wurden darauf mit den in der Genbank "Igblast - Blast for Nucleotide Sequences"[40]des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) publizierten Sequenzen verglichen. Bei allen sequenzierten Proben konnte das charakteristische VDJ-Rearrangement bestimmt werden. Die dabei ermittelten Homologien des jeweiligen V_H -Gens lagen im Bereich von 85,9%-100%, durchschnittlich bei 91,8%.

Bereich	Mittelwert	Maximum	Minimum	Länge Ø
				(bp)
VH	91,8 %	100%	85,9%	82,8

 Tabelle 4.6:
 Homologievergleich der VH-Segmente

Bei den Patienten H.A. und L.B., bei denen auch Verlaufskontrollen durchgeführt wurden, wurde als Kontrolle der FR3-Primer-Ansatz zweimal bzw. sowohl der FR3-Primer- als auch ein Leader-Primer-Ansatz sequenziert, um durch die mehrfache Sequenzierung Fehler auszuschließen.

Query 1 5' TGGATCCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAGACACTCTATCTCCAAATGAACAG VH3-23 Query 61 CCTGAGCGCCGAGGACACCGGCCGTCTATTATTGTGCGAAAGATCGAGATTTTTGGAGTGG VH3-23A.....N-Re------D3-3 Query 121 GTATTATCTCCACTGGGGCCAGGGAACCCTG<mark>GTCACCGTCTCCTCAGGT</mark>A AAGCTTACA 3'179 D3-3 T..... N------JH1 _____ -....C.....C.....

Abb.4.9:Patient L. mit VH3-Rearrangement: Sequenz des CDR3-Rearrangements(Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer ; VH - Sonde ; JH - Primer)

Query VH1-46	5' CACAGAAGTTCCAGGGCAGATTCACCATGACCAGGGACATGTCCACAACCACAGCCT <mark>ACA</mark> 60 G.GT	0
Query VH1-46 D2-2	61 CAGACCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACATGGCTGTGTATTACTATGCAAGTGATTTTG 12 TGGGGCCP-N-Region	20
Query D2-2 JH4	121 ATATTGTAGTAGTACCAGCTGCTAACTCTCGCCCCAGACTCGGCTACTGGGGCCAGGGAA 18	80
Query JH4	181 CCCTG <mark>GTCACCGTCTCCTCAGGT</mark> 3' 203 	

Abb.4.10: Patient H.A. mit Leichtketten-Plasmozytom

```
----FWR1----
Query
    5' GGTTCTTCCCTCGTGGCGGCAACTCCCAGATGGGTTCCTCGTTCCCAGGTGCAGCCTG 60
VH4-59
     Ouerv
   61 CAGGTAGTATCGGGCCCAGGCACTGGTGAAGCCTTCGGCAGTACCCTGTCCCTCACCTGC 120
VH4-59
     -----Fwr2------
   121 AGTGTCTCTGGTGACTCCATCACTAGTTACTACTGGACCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGG 180
Query
VH4-59
     -----CDR2------
   Query
VH4-59
     .....G.....C.....C.....
     -----FWR 3------FWR 3------
Query
   241 CTCAAGAGTCGAGTCGCCATTTCACTGGACAGGTGCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAGGCT 300
VH4-59
     Query 301 GACCTCTGTGACCGCTGCGGACGCGGCCGTCTATTATTGTGACGAGAAGAATAAAATAGT 360
VH4-59
     (D3-22)
     -----.
JH5
     _____
     -----CDR3-----CV------
Query 361 GGTTTCGCACCCTGGGGACCAGGGATAGGTCTGGTCGTCGTCCCCCAGCCTCCACCAA 420
     396
     ....
D3-23
JH5
     \mathbf{C}_{\mathrm{Y}}
         _____
               ------
     _____
Query 420 GGGCCCATCGGTCTTCCCA 3'439
Cv
```

Abb.4.11 : Patient H.G. mit VH4-Rearrangement (amplifiziert mit Leader-Primer und cγ-Primer) (**Query: ermittelte Sequenz; Leader-Primer ;VH-FR3 - Primer ; VH - Sonde ;**cγ-**Primer**)

Bei 7 Patienten war es nach dem Homologievergleich gegen die Genbank nicht möglich, der ermittelten Sequenz ein bestimmtes VH-Gen innerhalb der betreffenden VH-Familie zuzuordnen, da sich bis zu drei Gene als gleichrangig homolog erwiesen (siehe Beispiel Patient F.) Als ursächlich hierfür ist die hohe Anzahl von Mutationen anzusehen.



Abb.4.12 : Patient F. mit drei gleichrangig homologen VH3-Genen

```
(Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer; VH - Sonde; JH - Primer)
```

Der Probenumfang der Untersuchung war zu gering, um einen Anhalt für die bevorzugte Verwendung bestimmter VH-Gene zu erhalten. Insgesamt wurden sieben Patienten mit VH1-, sechs Patienten mit VH3-, vier Patienten mit VH4- und eine Patientin mit VH6-Gen analysiert (bei der späteren Überprüfung der spezifischen Primer stellte sich heraus, daß es sich bei der sequenzierten VH6-Bande der Patientin A.C. nicht um den Tumorklon handeln konnte).

Patient	VH-	Germline-	Länge	Mutatio-	% Homologie
	Familie	Gen	(bp)	nen	
1. H.A.	1	1-46	85	11	87
2. L.B.	1	1-69	93	13	86
3. M.D.	1	1-2	90	6	93,3
4. E.M.	1	1-46	96	0	100
5. R.R.	1	1-69	92	13	85,9
6. E.Z.	1	1-3	86	11	87
7. S.H.	1	1-24	59	6	89,8
8. H.A.	3	3-7/ 3-21	76	9	88,2
9. B.D.	3	3-9	73	5	93,1
10. X.F.	3	3-7/3-21/3-	71	7	90,1
		11			
11. X.L.	3	3-23/3-53	75	7	90,7
12. K.W.	3	3-7/3-21	75	4	94,7
13. J.Z.	3	3-33/3-30	38	3	92,1
		/3-23			
14. H.G.	4	4-59	95	11	88,4
15. C.H.	4	4-59	93	3	96,7
16. H.P.	4	4-39	98	4	95,9
17. U.Q.	4	4-31	96	6	93,8
Total ø			82,8	6,7	91,8

Tabelle 4.7: Analyse der VH-Gene

4.3.2 Analyse der CDR3-Region

Bei der Analyse der CDR3-Regionen der von uns bestimmten Segmente zeigte sich folgendes Bild (siehe Tabelle 4.8):

Patient	VH-	Ν	Del	D	D	Del	Ν	JH	JH
	Familie	(bp)	(bp)		(bp)	(bp)	(bp)	Del 5'	
		3′	3′			5′	5′	(bp)	
1. H.A.	1	14	2	2-2	25	4	19	10	4
2. L.B.	1	11	3	2-2/2-15	10	18	18	17	6
3. M.D.	1	4	16	3- 16	8	13	44	23/26	4/5
4. E.M.	1	9	0	3-3	22	9	4	0	5
5. R.R.	1	10	3	2-2/2-15	10	18	18	17	6
6. E.Z.	1	21		-				7	4
7. S.H.	1	12	18	3- 16	7	12	37	12	4
8. H.A.	3	3	9	3- 10	12	10	11	8	6
9. B.D.	3	6	3	1-26	9	8	20	9	4
10. X.F.	3	7	5	6- 19	14	2	13	16	5
11. X.L.	3	4	7	3-3	22	3	3	15/11	1/4
12. K.W.	3	35		-				9	6
13. J.Z.	3	59		-				12	1/4
14. H.G.	4	7		-				5	5
15. C.H.	4	5	8	2-15	18	7	6	4	4
16. H.P.	4	0/7	13/	3-10 ; 5-	7 (14)	11/9	17/10	4	4
			4	24					
17. U.Q.	4	5	12	3-10	13	6	20	0	4

Tabelle 4.8: Analyse der CDR3-Regionen

Sequenzbereich	Mittelwert (bp)	Maximum (bp)	Minimum (bp)		
N-Segment V-D	N-Segment V-D 7,5		0		
N-Segment D-J	14,5	44	3		
D-Segment	15,8	25	7		
Deletion D 3'	8,5	18	1		
Deletion D 5'	6,4	16	0		
Deletion J 5'	Deletion J 5 ′ 10,3		0		
Total N-D-N	Total N-D-N 38,4		24		

Tabelle 4.9: N-Segmente, D-Segmente, J-Segmente (ohne Patienten 6,12,13,14)

In den Tabellen 4.8 und 4.9 läßt sich eindrucksvoll die enorme Variabilität der CDR3-Region ablesen. Alle D-Segmente sind von unterschiedlich langen Deletionen betroffen, wobei die 3'gelegene Deletion im Durchschnitt rund 2bp länger ist als die am 5' Ende bei einer Gesamtlänge des D-Segmentes von durchschnittlich 15,8bp. Bei zwei Patienten waren jeweils zwei D-Segmente beim Genbankvergleich gleichwertig homolog, vermutlich begünstigt durch die besonders großen Deletionen. Desweiteren konnte bei vier Patienten kein D-Segment bestimmt werden, da die betreffenden Segmente für einen Homologievergleich zu kurz waren und so eine sichere Zuordnung nicht möglich war. Bei einer Patientin waren zwei sehr kurze D-Segmente (je 7bp) kombiniert.

Query VH4-39	51	TCGATGGATCC <mark>CAACCCGTCCCTCAAGAGTC</mark> GAGTCACCATATCCGTAGACACGTCTAAG 60
Query VH4-39	61	A <mark>ACCAGTTCTCCCTGGAGCCTGAGCTTCTGT</mark> GACCGCCGCAGACTCGGCTGTGTATCCAC 120 AAT
Query VH4-39 D3-10 D5-24 JH4	121	TGTGCGAGACATCGGGGAAGATGGCCTGACATCCGCTTTGACTCCTGGGGCCAGGGAAAC 180
Query JH4	181	CCTG <mark>GTCACCGTCTCCTAGGT</mark> AAGCTTACA 3' 210

Abb.4.13 : Patient H.P. mit VH4- Rearrangement und zwei D-Segmenten

(Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer ; VH - Sonde ; JH - Primer; D-Segmente)

Auch bei den JH-Segmenten war in drei Fällen keine eindeutige Zuordnung des JH-Gens möglich. Diese Sequenzen waren durch außergewöhnlich große 5'- Deletionen gekennzeichnet und es ergaben sich in allen drei Fällen Homologien mit der JH-Familie 4, die zusätzlich im gesamten Untersuchungsgut mit 45% der Fälle deutlich überrepräsentiert ist. Die Familien zwei und drei waren in keinem VDJ-Rearrangement nachweisbar und die Familie eins nur in zwei Fällen, in denen gleichzeitig jeweils zwei JH-Gene gleichrangig homolog waren.

Jh-	JH1	JH2	JH3	JH4	JH5	JH6
Familie						
Anzahl	2	0	0	9	5	4
in %	10%	0	0	45%	25%	20%

 Tabelle 4.10:
 Jh-Familien-Verwendung im IgH-Lokus beim multiplen Myelom

4.4 Inzidenz somatischer Mutationen

Die von uns sequenzierten VH-Gene wiesen ein variables und insgesamt hochgradig mutiertes Sequenzmuster auf. Unter der Bedingung der korrekten Sequenzierung konnte eine durchschnittliche Mutationsrate von 0,092 (9,2 Mutationen auf 100 Basen) ermittelt werden, wobei die Mutationsrate des einzelnen Patienten auf bis zu 0,14 steigen konnte. Bei den Sequenzierungen, bei denen Leader-Primer und / oder C γ -Primer verwendet wurden, konnten auch in den FR3- und JH- Primer-Regionen Mutationen festgestellt werden.



Abb.4.14: VDJ-Rearrangement des Patienten L.B. Durch Sequenzierung des Ansatzes mit Leader-Primer läßt sich im VH1-FR3-Primerbereich eine Mutation feststellen, die bei Sequenzierung des Ansatzes mit VH1-FR3-Primer verborgen geblieben ist.



Abb.4.15: VDJ-Rearrangement des Patienten H.A. Durch Sequenzierung mit Cγ-Primer lassen sich im Anlagerungsbereich des JH-Primers vier mismatches feststellen.

(Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer ; VH - Sonde ;VH-Cγ-Primer; im Anlagerungsbereich des JH- Primers liegen vier mismatches)

4.5 Funktion der Taqman-Sonde und der Primer

Vor dem Hintergrund der hochgradig mutierten Sequenzen läßt sich auch das häufig nicht aussagekräftige Taqman-Signal erklären. In der folgenden Tabelle wird deutlich, dass die Mutationen willkürlich verteilt sind und sich innerhalb der Sondenanlagerungsbereiche innerhalb der VH-Familien keine "mutational hotspots" abzeichnen. War nur eine einzelne Mutation innerhalb des Sondenanlagerungsbereiches vorhanden, so war das Taqmansignal verwertbar (siehe 4.2 Abb. 4/5, Patient F., eine Mutation). Lagen mehr als zwei Mutationen im Anlagerungsbereich konnte aus dem Amplifikationsplot nicht mehr auf die verwendete VH-Familie geschlossen werden (Beispiel Abschnitt 4.2, Abb. 1/2, Patient L.B., drei Mutationen).

Patient	VH-	Sequenz	Anzahl
	Familie		Mutationen
1. H.Au.	1	ACA <u>CA</u> GA <u>G</u> CTGAGCAGCCTGA <u>C</u> ATCT	4
2. L.B.	1	AC <u>T</u> TGGA <u>C</u> CTGAGCAGCCTGAG <u>C</u> TCT	3
3. M.D.	1	ACATGGAGCTGAGCAG <u>A</u> CT <u>A</u> AGATCT	2
4. E.M.	1	ACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT	0
5. R.R.	1	ACATGGAGCTGAGC <u>T</u> GCCTGA <u>C</u> ATCT	2
6. E.Z.	1	ACATGGA <u>CT</u> CTGAG <u>G</u> AGCCT <u>C</u> AGAT <u>A</u> T	5
7. S.H.	1	Х	X
8. H.As.	3	AACAGCCT <u>TC</u> GAG <u>G</u> CG <u>C</u> GGACACG	4
9. B.D.	3	AACAG <u>T</u> CTGAGA <u>C</u> C <u>T</u> GAGGACACG	3
10. X.F.	3	AACAGCCTGAGAGCCGA <u>A</u> GACACG	1
11. X.L.	3	AACAGCCTGAG <u>C</u> GCCGAGGACACG	1
12. K.W.	3	AACAG <u>T</u> CTGAGAGCCGAGGACACG	1
13. J.Z.	3	Х	9
14. H.G.	4	ACCAGTTCTCCCTG <u>G</u> AGCTGA <u>C</u> CTCTGT	2
15. C.H.	4	ACCAGTTCTCCCTGACGCTGAGCTCTGT	1
16. H.P.	4	ACCAGTTCTCCCTG \underline{G} AG (\underline{C}) CTGAGC (\underline{T}) TCTGT	3
17. U.Q.	4	ACCAGTTCTCCCTGAAGCTG <u>GA</u> CTCTGT	2

 Tabelle 4.11: Mutationen im Anlagerungsbereich der Taqmansonde (unterstrichen jeweils die mutierten Basen)

Um bei ausgesuchten Patienten Verlaufskontrollen anfertigen zu können ist die optimale Funktion der Taqmansonde und ein somit einwandfreies Taqman-Signal erforderlich. Aus diesem Grund war es nötig, für die Patienten 1. H.As. und 2. L.B. neue Taqman-Sonden zu synthetisieren. Der neue Anlagerungsbereich der Sonde wurde durch Homologievergleich der Keimbahngene der jeweiligen VH-Familie so gewählt, daß die Sonde im nicht mutierten Bereich bindet und sie sich potentiell auch bei weiteren Patienten einsetzen läßt.

VH1-PROBE.SEQ	ACATGGAGCT	GAGCAGCCTGAGATCT	VH1-new.SEQ	GACCTGAGCAGCCTGA			
	x: ::::: :::	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		x:::::::::::x			
BSEQ	ACTTGGACCTO	GAGCAGCCTGAGCTCT	BSEQ	GACCTGAGCAGCCTGA			
	Alte	VH-Sonde		Neue VH-Sonde			
VH1-69 Lage der Sonde innerhalb der Sequenz von L.B.							
VH-Sonde	CT kras	CT KM L.B.					
	21,2	28,2					
alt	,						

Abb. 4.16: Beispiel alte und neue VH-Sonde Patient L.B.

Abb.4.17 : Beispiel alte und neue VH-Sonde Patient H.As.

-

VH3-PROBE.SEQ	AACAGCCTGAG	AGCCGAGGACACG	VH3	_21GL.SE(CGAGGACACGGCTG X: <mark>:</mark> ::::::::X
AsSEQ	AACAGCCTTCGAGGCGCGGACACG Alte VH-Sonde			.SEQ	cgcggacacggctg Neue VH-Sonde
Query 5, 53 Query VH3-7	ATGAACGCCTTCGAG ATG <mark>AACGCCTTCGAG</mark> GA Lage der Sonder	G <mark>CGCCGGACACGGCTG</mark> GCGCCGGACACG CA n innerhalb der Seo	TGTATT TGTATT quenz v	ACTGTGTGTG ACTGTGTGG C von H.As.	GAGAGAG 103 GAGAGAG 3'
VH-Sonde	CT kras	CT KM H.A.			
alt	21,3	55	ļ		
neu	21,2	25,5			

4.6 Bestimmung und Kontrolle des Tumorklon-spezifischen Primers (ASO-Primer)

Die Bestimmung der 3' allel-spezifischen Primer erfolgte mit Hilfe der Oligo-6-Software unter Berücksichtigung der in 3.5 genannten Kriterien. Die ermittelten Primer wurden darauf mit der DNA von zehn Normalpersonen (gesunde Spender) im PCR-Ansatz (3'-ASO-Primer mit 5'-VH-FR3-Consensus-Primer) auf ihre Spezifität getestet und die Ansätze in der Gelelektrophorese kontrolliert. Es durfte sich weder ein Taqmansignal noch eine distinkte Bande in der Elektrophorese zeigen. Wenn die klonale Spezifität nicht bestätigt werden konnte, wurde ein neuer ASO-Primer synthetisiert und getestet. Die PCR-Bedingungen und Konzentrationen entsprachen den in Abschnitt 3.7 beschriebenen. Im Anschluß wurden die klon-spezifischen Primer mit jeweils der DNA-Probe getestet, aus der das jeweilige für den Patienten spezifische VDJ-Rearrangement des Tumorklons bestimmt worden war.

Query VH3-7	5' CTTGGATCC <mark>TTCACCATCTCCAGAGACAA</mark> CGCCAAAAATTCACTGTATTACAAATGAACA 60
Query VH3-7 D3-10	61 GCCTTCGAGG <mark>CGCGGACACGGCTG</mark> TGTATTACTGTGTGGAGAGAGGTGGTTCGCG <mark>GAGCT</mark> 120 GACACCCCC
Query JH6	-ASO-P> 121 AACCCAAAATACTACTATGGTATGGACGTCTGGGGGCCAGGGGGACCACG <mark>GTCATCGTCTCT</mark> 180 -N-REGCC
Query JH6 C-Y	181 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG <mark>TCTTCCCCCTGGCACCAG</mark> AAG 3' 226

Abb. 4.18: Festlegung des ASO-Primers bei Patient H.As. (Verlauf 1) (Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer ; neue VH - Sonde ;VH-Cγ-Primer; JH-Primer; ASO-Primer)



Abb. 4.19: Festlegung des ASO-Primers bei Patient L.B. (Verlauf 2) (Query: ermittelte Sequenz; VH-FR3 - Primer ; neue VH - Sonde ; JH-Primer; ASO-Primer)

4.7 Quantitative PCR-Analysen im Krankheitsverlauf von Patienten mit multiplem Myelom

Wie unter 4.3 ausgeführt wurden 17 Tumorsequenzen erfolgreich sequenziert. Bei zwei ausgewählten autolog transplantierten Patienten wurden mit Hilfe der quantitativen "real-time" PCR und einem allel-spezifischen Primer (ASO-Primer) Verlaufskontrollen durchgeführt. Bei dem ersten Patienten (Nr.8, Tab.4.7) wurde im Alter von 59 Jahren ein IgG-Plasmozytom hohen Reifegrades vom Leichtkettentyp Kappa im Stadium IIIA diagnostiziert. Das Knochenmark wies zu diesem Zeitpunkt zytologisch eine Plasmazellinfiltration von 35% auf. Nach einer Chemotherapie mit vier Zyklen Idarubicin/Dexamethason konnte eine partielle Remission (2,5 % Plasmazellen im KM), nach IEV-Mobilisierungszyklus eine komplette Remission (Serum/Urin) diagnostiziert werden. Dann erfolgte eine Tandemhochdosischemotherapie mit Melphalan und autologer PBSCT. Die dann folgenden Kontrolluntersuchungen bestätigten eine Vollremission. Die Reduktion der Tumorzellzahl läßt sich in der quantitativen PCR im Krankheitsverlauf verfolgen. Es kam zu einem adäquaten Abfall im Knochenmark auf 10/10⁵. Im peripheren Blut waren nach der 1. und 2. Hochdosischemotherapie zunächst keine Myelomzellen mehr

nachweisbar, dann aber wieder $8-10/10^5$, ein Befund, der schwer interpretierbar ist: negativ oder schwach positiv oder "unspezifische Reaktivität" auf andere B-Zellen (?).



Abb. 4.20.: Patient 1 (H.As.) mit Plasmozytom im Stadium IIIA bei Diagnosestellung Verlaufskontrollen mit der quantitativen "real-time"-PCR mit einem Allelspezifischen Primer für das Klon-spezifische CDR3-Rearrangement zum Nachweis des Myelomklons vor und nach autologer PBSCT (PB: peripheres Blut; KM: Knochenmark ; neg.: unter der Nachweisgrenze; Ida/Dexa; Idarubicin/ Dexamethason; IEV: Mobilisierungszyklus mit Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid; PBSCT: periphere Blutstammzelltransplantation)

Bei dem zweiten Patienten wurde im Alter von 53 Jahren ein IgG-Plasmozytom, Leichtkette vom Typ Kappa, im Stadium I diagnostiziert, das zu diesem Zeitpunkt eine Knochenmarksinfiltration mit Plasmazellen von 14,5% zeigte. Ein Jahr später konnte bereits ein Stadium IIA mit 23% Plasmazellen festgestellt werden. Im zytologischen Knochenmarksbefund zehn Monate später wurde eine Befundprogression auf 35,5% Plasmazellen nachgewiesen.Trotz drei Zyklen Idarubicin/Dexamethason kam es zu einer weiteren Befundprogression, weshalb zwei weitere Chemotherapien mit CAD (Cyclophosphamid/Adriamycin/Dexamethason) und IEV

(Ifosfamid/Epirubicin/Etoposid), gefolgt von einer Leukapherese, anschlossen. Darauf befand sich der Patient in partieller Remission. Dann folgte eine HDCT mit autologer Stammzelltransplantation. Auch nach der Hochdosischemotherapie waren mit der ASO-PCR noch Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar, und zwar $>10^{3/1}10^{5}$, zytologisch wurden rund 5-10% Plasmazellen nachgewiesen. Beide Befund passen also rein zahlenmäßig gut zusammen.



Abb. 4.21.: Patient 2 (L.B) mit Plasmozytom im Stadium IA bei Diagnosestellung und Stadium IIIA vor Beginn der Chemotherapie

Verlaufskontrollen mit der quantitativen "real-time"-PCR mit einem Allelspezifischen Primer für das Klon-spezifische CDR3-Rearrangement zum Nachweis des Myelomklons vor und nach autologer PBSCT (PB: peripheres Blut; KM: Knochenmark ; neg.: unter der Nachweisgrenze; Ida/Dexa; Idarubicin/ Dexamethason; CAD: Cyclophosphamid, Adriamycin, Dexamethason. IEV: Mobilisierungszyklus mit Ifosfamid, Epirubicin, Etoposid; PBSCT: periphere Blutstammzelltransplantation)

5. Diskussion

5.1 Etablierung einer Allel-spezifischen PCR (ASO-PCR) f ür rearrangierte V_H-Gene des IgH-Locus bei Patienten mit multiplem Myelom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Nachweis von Tumorzellen beim multiplen Myelom eine PCR-Methode getestet, die mit Hilfe der tumorklonspezifischen rekombinierten Immunglobulinsequenzen eine hochspezifische Gensequenz als Nachweisziel hat. Diese Methode kann zur Verlaufskontrolle, zur Therapieevaluation und zur Tumornachsorge genutzt werden. Zur Identifikation des Klons wurden VH-Familien-spezifische Primer für die höher konservierten Bereiche der Leader- und FR3-Region sowie für die JH- und C-Region verwendet. Dieser PCR-Ansatz wurde im Vorfeld bei Patienten mit CLL bereits etabliert. Insgesamt konnte bei 20 von 26 untersuchten Myelompatienten das VDJ-Genrearrangement bestimmt und der jeweils beteiligten VH-Familie zugeordnet werden. Wegen der vermutlich zu stark mutierten Gensequenz war bei sechs Patienten die Identifikation des Myelomklons nicht möglich (s.5.4).

Da in der Agarosegelelektrophorese bei einigen Patienten zusätzliche schwache, unklar abgrenzbare Banden zu sehen waren wurde an ausgewählten Patienten ein Gen-Scan durchgeführt, der die schwer abgrenzbaren Banden als Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Größe identifizierte. Vermutlich handelt es sich hierbei um die Rearrangements weiterer B-Zell-Subpopulationen.

Von 18 Myelomklonen wurden 17 erfolgreich sequenziert und analysiert (4.3, Tab.7). Bei einem Klon konnte trotz mehrerer Versuche keine eindeutige Sequenz bestimmt werden. Eine eindeutige Festlegung des beteiligten VH-Gens war aufgrund gleichrangiger Homologie im Genbankvergleich bei sieben Patienten nicht möglich. In den Sequenzanalysen wurde mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von 0,092 eine hohe Anzahl somatischer Mutationen nachgewiesen, wodurch der Anteil der nicht analysierbaren Myelomklone erklärt werden kann. Nach Synthese und Kontrolle der Tumorklon-spezifischen ASO-Primer sowie Optimierung der Taqman-Sonden wurden bei zwei klinisch interessanten Patienten Verlaufskontrollen durchgeführt, bei denen sowohl Knochenmark als auch Blut untersucht wurde.

5.2 Rearrangement der Vh, Dh und Jh-Gene beim multiplen Myelom

Bei der Analyse der Verwendung von VH-Genen beim MM wird in der Literatur ein relatives Überwiegen von VH1-69, Vh3-9, VH3-23 und VH3-30 beschrieben[86;114]. Im Gegensatz dazu sind andere Gene deutlich unterrepräsentiert, wie VH3-49 und VH3-53 bzw. fehlen völlig, wie VH4.21 (VH4-34) [74;86]. Es ist auffällig, daß gerade das Gen VH4.21 (VH4-34) bei anderen B-Zell-Erkrankungen signifikant häufiger vorkommt, beispielsweise bei der ALL in 8-33% der Fälle, in normalen B-Zellen in 5-10% [87]. Es kodiert Autoantikörper mit Kälteagglutininspezifität. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß dieses Autoimmunphänomen beim multiplen Myelom so selten zu beobachten ist.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich ähnlich den Literaturangaben ein Überwiegen der VH-Familien 1,3 und 4, wobei allerdings die VH-Familie 1 häufiger verwendet worden ist als die sonst dominierende VH3-Familie. Vescio et al. fanden bei etwa 50% der Klone ein Rearrangement mit VH3-Beteiligung. Die Verteilung bei unseren Ergebnissen kann am relativ kleinen Probenumfang (n=26) liegen.

Diagnose	Ν	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	Literatur
B-ALL	151	20	11	76	23	4	17	[115]
B-CLL	56	11	3	26	12	2	2	[93]
Follikuläres	31	3	0	19	8	1	0	[116]
Lymphom								
MM	72	13	4	34	14	6	1	[86]
MM	48	7	4	24	8	4	1	[74]
MM	7	1	0	6	0	0	0	[81]
Total MM	127	17%	6%	50%	17%	8%	2%	
MM	26	7	1	7	5	0	0	vorliegende
								Arbeit

 Tabelle 5.1: Verteilung von VH-Familien bei neoplastischen B-Zellen

Bei den D-Genen fiel keines durch ein signifikant häufigeres Rearrangement auf. Erwähnenswert sind die ausgeprägten Deletionen, die die D-Gene sowohl am 5'-Ende und als auch besonders am 3'-Ende aufweisen. In Verbindung mit den Deletionen der J-Segmente, von denen besonders häufig JH4 im VDJ-Rearrangement kombiniert war (45% der Fälle), veranschaulicht dies mit den zusätzlichen Nukleotiden der N-Segmente die außerordentliche Variabilität der CDR3-Region. Die insgesamt nachgewiesene JH-Verteilung ist der in der Literatur beschriebenen vergleichbar[16;81;117] mit Dominanz der JH-Segmente 4, 5 und 6.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Verteilung der VH-Familien weitgehend der des normalen B-Zell-Repertoirs entspricht. Bei der Betrachtung individueller VH-Gene fällt aber die Exklusion des VH4-34-Gens auf, das bei normalen B-Zellen in 5-10% der Fälle auftritt[86;87].

5.3 Stabilität des VDJ-Rearrangements im Krankheitsverlauf und genetische Stabilität des Myelomklons

Der Nachweis der minimalen Resterkrankung im Krankheitsverlauf und im Anschluß an die Behandlung ist abhängig von der dauerhaften Stabilität der gewählten Zielsequenz, hier also des VDJ-Rearrangements der Tumorzelle. Während andere B-Zell-Erkrankungen wie die akute lymphatische Leukämie Veränderungen der IgH- Gensequenz im Sinne einer "klonalen Evolution" aufweisen[118] oder multiple Klone haben können[119], zeigt sich beim MM trotz einer extrem hohen Mutationsrate in den VH- Genabschnitten des VDJ-Rearrangements[73;74] keine intraklonale Diversität und eine bleibende Stabilität des Klons im Krankheitsverlauf[76;78;120]. In einer Untersuchung von Davies et al. zeigte sich bei 8 von 14 Patienten in kompletter Remission, die vorher alle PCR-negativ waren, zum Zeitpunkt des Relapses wieder das initial bestimmte IgH-Rearrangement[121]. Auf der anderen Seite konnte man belegen, daß in Verlaufskontrollen aufgetretene oligoklonale Banden in der Elektrophorese nicht mit dem Tumorklon in Bezug standen und vermutlich durch die sich rekonstituierenden B-Zellen verursacht wurden.

Diese Ergebnisse belegen, daß es zu keiner fortschreitenden somatischen Hypermutation kommt[66;72-75;77;78;80;114]. Der Grund hierfür könnte sein, daß die Ursprungszelle des MM das Keimzentrum des Lymphknoten bereits verlassen hat. Sie unterliegt so nicht weiteren Mutationsmechanismen, hat also vermutlich den Entwicklungsweg zu einer reifen Plasmazelle vor Eintritt der neoplastischen Veränderung zurückgelegt oder das malignisierende Ereignis beeinflußt die Entwicklung der B-Zelle zur Plasmazelle nicht. Gegen einen späte maligne Transformation der Zelle spricht aber die Tatsache, daß man im Knochenmark koexistente IgM-positive B-Zellen der gleichen CDR3-Sequenz gefunden hat wie die des isotyp-gewechselten (IgA, IgG) Tumorklons[75;79;122]. Ob diese Zellen durch ein zweites neoplastisches Ereignis ihren Iso-Typ noch wechseln und so ein malignes Potential erhalten können (maligne Vorläuferzelle) ist unklar. Zusammenfassend besteht Einigkeit darüber, daß die Gensequenz des VDJ-Rearrangements des Myelomklons im Verlauf der Erkrankung auch unter dem Einfluß der Therapie keiner Veränderung unterliegt und so ein ideales Ziel für den Nachweis mittels PCR bietet.

5.4 Technische Probleme verursacht durch somatisch hypermutierte VH-Gene von Plasmozytomzellen

Die normale Entwicklung zur Plasmazelle beginnt bei der produktiven Stimulation eines reifen B-Lymphozyten durch ein Antigen. Dieser teilt sich und kann sich in B-Memory-Zellen und Plasmablasten differenzieren, die sich zuletzt zu kurzlebigen Plasmazellen mit maximal drei Tagen Überlebenszeit entwickeln. Das von den kurzlebigen Plasmazellen sezernierte Immunglobulin ist in der Regel vom IgM-Typ und meist nicht somatisch hypermutiert. Wenn aktivierte B-Lymphozyten in das Keimzentrum eines Lymphknoten gelangen, wo sie durch ein Antigen stimuliert werden, vollzieht sich eine durch Rearrangement und somatische Hypermutierten Immunglobulinsequenzen. Bleibt nun eine weitere Konfrontation mit dem Antigen aus, dann kommt es zum Zelltod. Auf der anderen Seite können diejenigen Plasmablasten, die einen Schwerketten-"Switch" durchgeführt haben, ins Knochenmark wandern, wo sie sich zu langlebigen Plasmazellen differenzieren (ca. ein Monat Überlebenszeit).



Abb.5.1: Plasmazellentwicklung[123]

Bei unseren Untersuchungen konnten wir bei nur rund 75% der Myelomklone das VDJ-Rearrangement bestimmen, wofür verschiedene Gründe möglich sind. Die Tumorzellen infiltrieren beim multiplen Myelom das Knochenmark sehr inhomogen und liegen in Form von Plasmazellnestern vor, was bei der Gewinnung der Proben zur falschen Einschätzung des Myelomzellgehaltes sowohl im Knochenmark selbst als auch im Untersuchungsgut führen kann[124]. Die Untergrenze des Plasmazellgehaltes der Probe zur Bestimmung des Tumorklons wurde von uns mehr oder weniger willkürlich auf 10% festgelegt, wobei durch die Aufarbeitung der Probe dieser Wert gewissen Schwankungen unterliegt und nur der groben Orientierung dienen kann. Es könnten also Proben mit einem äußerst geringen Plasma- und somit Tumorzellgehalt zur Untersuchung kommen. Andererseits konnte auch bei einigen Patienten, die einen Plasmazellgehalt im Knochenmark von über 50% aufwiesen, der Klon nicht bestimmt werden. Der Grund hierfür dürfte in der hohen somatischen Mutationsrate der VH- und JH-Abschnitte des IgH-Rearrangements zu suchen sein, wobei wir die Anzahl der Mutationen der exprimierten Gene durch Vergleich mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen ermittelt haben. Bei einer durchschnittlichen Mutationsrate der bestimmten VH-Gene von 0,092 (9,2 Mutationen auf 100 Basen) sind auch die im VH-Bereich liegenden Primerregionen bei einer durchschnittlichen Länge von rund 20bp von etwa zwei Mutationen betroffen, was die Primeranlagerung verhindern und so die Amplifikation der Zielsequenz unmöglich machen kann. Vergleichbare Werte sind von Vescio et al. publiziert worden mit durchschnittlich 8,2 Mutationen pro 100 Basen (Schwankungsbreite zwischen 2,7-16,5). Durch einzelne Mutationen in den Primerbereichen, die unerkannt bleiben, sowie durch hochgradig mutierte Tumorsequenzen, die sich unter den nicht bestimmten Myelomklonen befinden können, kann eine noch höhere durchschnittliche Mutationsrate vermutet werden. Es ist bemerkenswert, daß ein hoher Prozentsatz dieser somatischen Mutationen in Bereich der CDR-Regionen den Austausch von Aminosäuren nach sich zieht, was auf einen antigengesteuerten Reifungsprozess der Myelomvorläuferzelle hindeutet[125]. Über die mögliche klinisch-prognostische Bedeutung des Mutationsgrades der VH-Gene beim multiplen Myelom analog der Bedeutung bei der B-CLL (Patienten mit mutierten VH-Genen haben eine bessere Prognose[126]) ist nichts bekannt. Karyotypische Anomalien, die z.B. mittels Fluoreszens-in-situ-Hybridisierung nachzuweisen sind, spielen hier offensichtlich eine größere Rolle, beispielsweise die 13q-Deletion, die ein hohes Risiko für schlechtes Therapieansprechen und kürzere Überlebenszeiten bedeutet[9;10].



Abb.5.2: Prognostische Bedeutung von genetischen Veränderungen[10]

Über den Mutationsstatus der JH-Region findet sich in der Literatur kaum eine Aussage, obwohl verschiedene Gruppen JH-Consensus-Primer bei ihren Untersuchungen verwendet haben. Im

Vergleich der von uns sequenzierten VDJ-Rearrangements mit den entsprechenden Keimbahngenen lassen sich auch im Bindungsbereich des JH-Primers Mutationen feststellen. Aus den obigen Ausführungen kann man schließen, daß es vermutlich keine einzelne Primerkombination gibt, mit der man bei 100% der Myelom-Patienten das individuelle VDJ-Rearrangement des IgH-Lokus bestimmen kann. Durch Variation der PCR-Ansätze läßt sich aber das Gesamtergebnis verbessern. Besonders eindrucksvoll kann dieser Zusammenhang beim Patienten H.As. bestätigt werden. In der unter 4.7 dargelegten Sequenz liegen im Bindungsbereich des JH-Primers vier Mismatches. Alle PCR-Ansätze mit JH-Consensus-Primer konnten deswegen nicht zum Erfolg führen.

Vor diesem Hintergrund ist die Untersuchung von Vescio et al.[74] kritisch zu bewerten. Hier konnten 100% aller Klone bestimmt werden. Bei anderen Forschergruppen liegt der Anteil der bestimmten Klone zwischen 67 und 84%, wobei Unterschiede in der Zusammensetzung der ausgewählten Patienten und bei den verwendeten PCR-Tests zu bedenken sind.

Literatur	Ν	erfolgreich	in Prozent	Myelomtyp
		bestimmt		
[127]	18	15	83%	k.A.
[128]	51	43	84%	42IgG/IgA
				7 LK
				2 asekretorisch
[129]	36	24	67%	k.A.
[130]	36	27	75%	k.A.
[86]	88	72	81%	k.A.
[74]	48	48	100% (!)	IgG/IgA
unsere	21	18	85%	IgG/IgA
Ergebnisse				

Tab.5.2: Vergleich der Ergebnisse bei der Bestimmung des VDJ-Rearrangements (k.A.= keine Angaben)

Auch die Bereiche für die Anlagerung der Taqmansonde im VH-Gen weisen folglich Mutationen auf. Dies ist eine Erklärung für das häufig nicht verwertbare Tagman-Signal und stellt daher die Effektivität des Consensus-Probe-Prinzips für die Real-Time-PCR beim multiplen Myelom in Frage[130]. Aus diesem Grund war für die Verlaufskontrollen der Patienten H.As. und L.B. die Synthese einer neuen Taqmansonde erforderlich. Bei einer Untersuchung von Ladetto et al.[131] zeigte sich durch speziell an den Sequenzen von MM-Patienten ausgerichteten Gensonden eine deutlich bessere Effektivität als bei den vorher verwendeten Sonden, die für den Gebrauch bei der prä-B-ALL synthetisiert worden waren[115]. Dies wurde auch auf den unterschiedlichen VH-Gen-Gebrauch bei MM und ALL zurück geführt [81;86]. Besonders für die VH-Familie 3 wurden mehrere Gensonden verwendet. Waren bei der Sonde drei oder mehr Mismatches zu verzeichnen, war die Sonde praktisch unbrauchbar, wogegen ein einzelner Mismatch immer toleriert wurde, was einen engen Zusammenhang zwischen Effektivität der Sonde und der Anzahl der Mismatches belegt. Man kann also die Länge der Sonde nicht erhöhen ohne weitere Mismatches zu verursachen. Auch bei einer Untersuchung von Willems et al. [132] traten Probleme bei der Entwicklung einer Consensus-Probe-Strategie auf. Zur Quantifizierung von Myelomzellen wurde allgemein die Verwendung von mindestens zwei Consensus-Probes pro VH-Familie vorgeschlagen, bei Ladetto et al.[131] wird dies nur für die Familien VH1-4 gefordert. Bei unseren Untersuchungen war es selbst durch den Vergleich von nur drei Tumorsequenzen der VH3-Familie nicht möglich, eine besser passende Sonde zu entwerfen, da sich auch im Sequenzvergleich keine Bereiche zeigten, die von Mutationen weniger oder gar nicht betroffen waren.

5.5 Vergleich etablierter und neuer Methoden zur Diagnose und Verlaufskontrolle beim multiplen Myelom

Bei der Therapie des multiplen Myeloms ist es für den behandelnden Arzt von größter Wichtigkeit, zuverlässige Informationen über das Ausmaß der Erkrankung möglichst frühzeitig zu gewinnen, um im Verlauf gezielt therapeutische Maßnahmen einleiten zu können. Während in der Vergangenheit altbewährte klinisch-chemische Diagnostik ausreichend war, erfordern heute neue Therapieansätze auch neue und vor allem sensitivere Methoden zur Verlaufskontrolle und Diagnostik. Einen diagnostisch richtungsweisenden charakteristischen Befund stellt nach wie vor der Nachweis monoklonaler Immunglobuline in Serum und Urin dar. Als Verlaufsparameter ist das Immunglobulin aber nur eingeschränkt verwertbar, da wegen der individuellen Sekretionsrate des Myelomzelltyps (Differenzierungsgrad) die Korrelation zur Tumorzellmasse variiert. In der klassischen Proteinelektrophorese zeigt sich hier ein sogenannter M - Gradient (s.Abb.5.3), der aber bei niedriger Konzentration des Immunglobulins nicht mehr eindeutig nachweisbar ist und dann nicht immer die zweifelsfreie Einordnung in die Immunglobulinklasse erlaubt.



Abb.5.3: Elektrophorese der Serumproteine bei einem Patienten mit Plasmozytom: monoklonale IgG- Vermehrung (normal γ-Globulinfraktion: 5,3-15,5 g/l, hier 49,6 g/l)

Mit Hilfe der Immunelektrophorese und Immunfixationselektrophorese(IFE) stehen sensitivere Verfahren zur Verfügung, die aber ebenfalls bei niedriger Konzentration des monoklonalen Immunglobulins Probleme bei der Abgrenzung zu oligoklonalen Gammopathien haben. Zur Bestimmung der freien Leichtketten im Urin dient die IFE, die zwar eine klinische Routinemethode darstellt, aber sehr aufwändig und nicht sensitiv genug ist. Zur Abschätzung der Konzentration des Paraproteins kann die quantitative Bestimmung der Immunglobuline/freien Leichtketten mittels Nephelometrie oder Turbidimetrie dienen.

Neuere Ansätze konzentrieren sich v.a. auf den Nachweis von Leichtketten im Serum[133], der deutlich sensitiver als der Nachweis im Urin ist und bei therapeutischen Maßnahmen auch schneller reagiert (Serumhalbwertszeit von LK:2-4h, von IgG 20-25 Tage). Das Verfahren erfordert weniger Laboraufwand und erübrigt das Sammeln von Urin. Es werden auch asekretorische Myelome (1-4% aller multiplen Myelome) mit erfaßt, die in 50-80% aller Fälle pathologisch erhöhte Werte freier Leichtketten aufweisen[134]. Dieser Test bietet sich v.a. zur Diagnostik monoklonaler Gammopathien an, es fehlen aber Daten über die Anwendung zur

Überwachung von (transplantierten) Patienten in kompletter Remission. Hier stellt sich besonders die Frage, ob die Sensitivität ausreicht, frühzeitig einen Relaps nachweisen zu können.

Die quantitative ASO-PCR bietet sich als hochspezifisches Verfahren, das die Tumorzelle direkt nachweist, an, Patienten in kompletter Remission zu überwachen und mittels eines MRD-Monitorings zu verfolgen. Die Sensitivität des Ansatzes übertrifft die klassischen Nachweismethoden bei weitem. Besonders Risikopatienten nach allogener oder autologer Transplantation könnten unter Umständen von einer sensitiveren Tumordiagnostik profitieren.

5.6 Praktische Anwendung der allel-spezifischen PCR (ASO-PCR) und klinische Relevanz der MRD-Diagnostik bei neuen Therapieansätzen

5.6.1 Allgemeines

Das Durchschnittsalter eines Patienten mit multiplem Myelom liegt bei ca. 65 Jahren. Wegen des hohen Alters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erfordert die Wahl der Therapie neue prognostische Faktoren und diagnostische Methoden, um den Subgruppen der Myelompatienten die optimal zugeschnittene Behandlungsstrategie zukommen lassen zu können. Dazu kommt, daß immer mehr Patienten zufällig mit asymptomatischer Tumorlast diagnostiziert werden und man sich die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt des Therapiebeginns stellen muß[135]. Während der Therapie, zur Verlaufskontrolle der Erkrankung und zur Steuerung einer u.U. nötigen Immunsuppression, zur Evaluation neuer Therapieansätze und letztendlich zur Erforschung und zum Verständnis der Pathophysiologie des multiplen Myeloms stellt das präzise Monitoring der Tumorzelllast einen wichtigen Parameter dar. Mit Hilfe quantitativer PCR-Techniken gelang es in den letzten Jahren, die Überwachung residualer Tumorzellen bei verschiedenen B-Zell-Erkrankungen zu perfektionieren und zur Verlaufskontrolle und Therapieoptimierung zu nutzen. Durch das Monitoring der Resttumorlast (minimal residual disease, MRD) konnten auch wichtige Informationen über die Prognose betroffener Patienten, insbesondere über die Gefahr eines Relapses, gewonnen werden [136;137]. Die hohe Sensitivität der quantitativen "real-time" PCR, speziell bei Verwendung von spezifischen ASO-Primern (eine klonale Zelle in 10⁵ -10⁶ normalen Zellen), kann so dazu beitragen, bei Patienten eine Aussage über die Qualität einer klinisch kompletten Remission zu machen. Dies ist besonders vor dem Hintergrund wichtig, daß durch neue therapeutische Ansätze und neue Medikamente ein immer höherer Prozentsatz der Betroffenen den Zustand einer kompletten Remission erreicht, dann aber, vermutlich durch residuale Tumorzellen, relabiert. Auf der anderen Seite bleibt ein gewisser Teil der Patienten trotz nachweisbarer Resttumorzellbelastung über Jahre stabil. Hier könnte die PCR-basierte molekularbiologische Überwachung des Patienten im Verlauf der Erkrankung neue Einsichten in das pathophysiologische Verhalten des Tumorklons und bisher unbekannte beeinflussende Faktoren eröffnen. Beim multiplen Myelom wäre insbesondere die Verlaufskontrolle am peripheren Blut ein attraktives Überwachungsziel, da es dem Patienten die schmerzhafte Prozedur der Knochenmarkpunktion ersparen könnte. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß sich in beiden Kompartimenten klonale Tumorzellen nachweisen lassen und auch in der Literatur konnten im peripheren Blut zirkulierende klonale Tumorzellen bestätigt werden. [95;138-140] Inwiefern diese Zellen eine Aussage über die individuelle Krankheitsaktivität (d.h. auch die proliferative Aktivität der Myelomzellen) erlauben, oder gar ein Grund für Relapse, Therapieversagen und Resistenzentwicklung sein können, ist unklar und Gegenstand von Diskussionen[94;105;141-147]. Mit der quantitativen ASO-PCR hat man ein diagnostisches Instrument, eine Aussage über die individuelle Tumorzelllast treffen zu können. In weiteren Studien sollte untersucht werden, inwiefern der Nachweis von Tumorzellen in den beiden Kompartimenten Blut und Knochenmark einen Einfluß auf die individuelle Prognose des Patienten hat.

5.6.2 Multiples Myelom und autologe Stammzelltransplantation

Je nach Stadium und Alter des Patienten stehen bei der Behandlung des multiplen Myeloms die konventionelle Chemotherapie, die Hochdosischemotherapie mit Reinfusion autologer Knochenmark- oder Blutstammzellen und die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung. Bei der autologen Stammzelltransplantation, bei der die aus dem Knochenmark mobilisierten Stammzellen mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnen werden, stellt die Kontamination des extrahierten Transplantates mit Tumorzellen ein viel diskutiertes Problem dar[100;127;148-151]. Durch verschiedene PCR-Analysen ließ sich feststellen, daß dem Patienten oft ein nicht unerheblicher Anteil von Tumorzellen nach der HDCT reinfundiert wurde. Dieser Umstand wird potentiell als Faktor für eine Rezidiventstehung nach Transplantation bewertet. Folglich versuchte man, durch eine *Ex-vivo*-Tumorzelldepletion mittels CD34-Selektion ("Purging") die Transplantate aufzureinigen und so die Rezidivhäufigkeit zu verringern. Obwohl

die Effektivität dieses Verfahrens durch patientenspezifische CDRIII-PCR-Analyse belegt[99] und die transplantierte Tumorzellzahl erheblich verringert werden konnte, ergab sich innerhalb großer Studien keine Verbesserung hinsichtlich ereignisfreiem Überleben und Gesamtüberleben. Hierbei gilt es zu bedenken, daß die Aufreinigung der Transplantate nicht mit einer totalen Beseitigung aller Tumorzellen einhergeht. Lemoli et al. zeigten, daß das Purging keinen Einfluß auf das Erreichen oder die Dauer einer kompletten Remission hatte, weder klinisch noch in der molekularbiologischen Überwachung[102]. Ähnliche Daten publizierten Stewart and Vescio [101]. Barbui[103] und Straka[152] zeigten bei Verwendung eines anderen Aufreinigungsverfahrens mögliche Vorteile für die Patienten, die mit gereinigten Produkten transplantiert wurden. Insgesamt stellen diese Ergebnisse die therapeutische Bedeutung des Purging von autologen Stammzelltransplantaten beim multiplen Myelom in Frage und weitere Studien sind erforderlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Einigkeit darüber besteht, daß allein das Erreichen einer kompletten Remission einen wichtigen Faktor für eine länger anhaltende Progressionsfreiheit nach autologer Transplantation darstellt[12;153]. Ob das Erreichen einer kompletten Remission mit PCR-Negativität im Gegensatz zu PCR-positiven Patienten die Prognose verbessert ist weiterhin nicht eindeutig geklärt. Corradini et al. vermuteten bei kleiner Patientenzahl einen Überlebensvorteil[154]. Swedin et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des nachgewiesenen MRD und dem klinischen outcome bei Patienten mit multiplem Myelom feststellen[129]. Bei anderen B-Zell-Lymphomen korrelierte dagegen PCR-Negativität nach PBSCT mit einer besseren Prognose[155;156].

5.6.3 Allogene Transplantation und neue Therapieansätze

Bei der Bewertung und Verbesserung neuer therapeutischer Ansätze hat man in verschiedenen Studien die quantitative PCR als diagnostische Hilfe genutzt und so die klinische Relevanz der Methode belegt. Corradini et al. verwendeten bei 29 allogen oder autolog transplantierten Patienten in klinisch kompletter Remission das IgH-Rearrangement als molekularen Marker[154]. Hierbei zeigte sich, daß nur 7% der autolog transplantierten Patienten eine "molekulare" Remission erreicht hatten, also auch mit der hochspezifischen PCR keine residualen Tumorzellen mehr nachweisbar waren. Bei den allogen transplantierten Patienten war der Anteil der
molekularen Remissionen mit 50% bedeutend höher. Bei einer späteren Untersuchung bestätigt sich dieses Ergebnis [157]. Von 48 allogen transplantierten Patienten erreichten hier immerhin 16 PCR-Negativität mit hochsignifikant geringerem Risiko eines Relapses innerhalb von fünf Jahren (Risiko 0%) im Gegensatz zu den PCR-positiven Patienten, die alle innerhalb dieses Zeitraumes relabierten. In anderen Untersuchungen scheint sich ebenfalls eine geringere Rezidivwahrscheinlichkeit und eine geringere Progression der Erkrankung nach allogener Transplantation abzuzeichnen[158-160]. Die Rate an molekularen Remissionen ist bei selektionierten Patienten teils noch höher[161]. Leider steht diesem positiven Aspekt eine hohe transplantationsassoziierte Mortalität gegenüber, wofür in einer Vielzahl der Fälle schwerwiegende infektiöse Komplikationen und im besonderen die Graft-versus-Host-Erkrankung verantwortlich sind. Letztere besitzt aber im Sinne eines Graft-versus-Myeloma-Effektes ein kuratives Potential, das bei allogen Transplantierten durch die Gabe von Spender-Lymphozyten ausgenutzt wird. Vermutlich handelt es sich um eine durch Spender-T-Zellen vermittelte Immunreaktion gegen die Myelomzellen des Empfängers. Die Effektivität dieses Verfahrens ist inzwischen durch mehrere Untersuchungen bestätigt worden und bietet vor allem bei relabierten Patienten eine neue therapeutische Option[162-165]. Zur besseren Steuerung der Graft-versus-Myeloma-Reaktion durch gleichzeitige optimal angepaßte therapeutische Immunsuppression könnte das molekulare Monitoring der MRD mittels einer quantitativen "real-time"-PCR einen wichtigen Beitrag leisten. In der Tumornachsorge nach autologer Transplantation wäre ein molekulares Rezidiv vor dem klinischen Rezidiv diagnostizierbar und es könnten frühzeitig therapeutische Konsequenzen, z.B. eine Therapie mit Bortezomib[166] oder neuen Derivaten des Thalidomid[167], gezogen werden.

Reference List

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA,
 Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and
 lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November,
 1997. Hematol J 2000; 1(1):53-66.

(2) Rettig MB. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. Science 1997.

(3) Bergui L, Schena M, Gaidano G, Riva M, Caligaris-Cappio F. Interleukin 3 and interleukin 6 synergistically promote the proliferation and differentiation of malignant plasma cell precursors in multiple myeloma. J Exp Med 1989; 170(2):613-618.

(4) Urashima M, Ogata A. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. Blood 1996.

(5) Shoenfeld Y, Berliner S, Shaklai M, Gallant LA, Pinkhas J. Familial multiple myeloma. A review of thirty-seven families. Postgrad Med J 1982; 58(675):12-16.

(6) Durie BG. The epidemiology of multiple myeloma. Semin Hematol 2001; 38(2 Suppl 3):1-5.

(7) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV. A longterm study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N-Engl-J-Med 2002.

(8) Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Cancer 1975.

(9) Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. J Clin Oncol 2000; 18(4):804-812.

(10) Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swantkowski J, Huh Y, Glassman A, Champlin R, Alexanian R. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. Br J Haematol 1998; 101(1):189-194. (11) Steensma DP, Gertz MA, Greipp PR, Kyle RA, Lacy MQ, Lust JA, Offord JR, Plevak MF, Therneau TM, Witzig TE. A high bone marrow plasma cell labeling index in stable plateau-phase multiple myeloma is a marker for early disease progression and death. Blood 2001; 97(8):2522-2523.

(12) Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Naucke S, Cheson B, Mattox S, Bracy D, Salmon S, Jacobson J, Crowley J, Tricot G. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. Blood 1997; 89(3):789-793.

(13) Kroger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Togel F,
 Wittkowsky G, Kuse R, Zander AR. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. Blood 2002; 100(3):755-760.

(14) Kroger N, Schilling G, Einsele H, Liebisch P, Shimoni A, Nagler A, Perez-Simon JA, San Miguel JF, Kiehl M, Fauser A, Schwerdtfeger R, Wandt H, Sayer HG, Myint H, Klingemann H, Zabelina T, Dierlamm J, Hinke A, Zander AR. Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation. Blood 2004; 103(11):4056-4061.

(15) Blade J. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma.Brit J Haematol 1998.

(16) Billadeau D, Blackstadt M, Greipp P, Kyle RA, Oken MM, Kay N, Van Ness B. Analysis of Blymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease. Blood 1991; 78(11):3021-3029.

(17) Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature 1983; 302(5909):575-581.

(18) Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(11):7096-7100.

(19) Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, Jaffe ES, Waldmann TA, Korsmeyer SJ. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. N Engl J Med 1983; 309(26):1593-1599.

(20) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230(4732):1350-1354.

75

(21) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239(4839):487-491.

(22) Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res 1992; 20(7):1717-1723.

(23) Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 1990; 93:125-128.

(24) Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT PCR. Genome Res 1996; 6(10):995-1001.

(25) Watson D, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2.Auflage, 1993.

(26) Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. Science 1973; 180(88):830-840.

(27) Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1995.

(28) Berman JE, Mellis SC, Pollock R, Smith CL, Suh H, Heinke B, Kowal C, Surti U, Chess L, Cantor CR, Alt FW. Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus. EMBO J 1988; 7:727-738.

(29) Buluwela L, Rabbitts TH. A VH gene is located within 95 Kb of the human immunoglobulin heavy chain constant region genes. Eur J Immunol 1988; 18(11):1843-1845.

(30) Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: molecular biology and regulation. Annu Rev Immunol 1992; 10359-83:-83.

(31) Stewart AK, Schwartz RS. Immunoglobulin V regions and the B cell. Blood 1994; 83(7):1717-1730.

(32) French DL, Laskov R, Scharff MD. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. Science 1989; 244(4909):1152-1157.

(33) Dreyer WJ, Bennett JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. Proc Natl Acad Sci U S A 1965; 54(3):864-869.

(34) Hozumi N, Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proc Natl Acad Sci U S A 1976; 73(10):3628-3632.

(35) Erikson J, Martinis J, Croce CM. Assignment of the genes for human lambda immunoglobulin chains to chromosome 22. Nature 1981; 294(5837):173-175.

(36) Malcolm S, Barton P, Murphy C, Ferguson-Smith MA, Bentley DL, Rabbitts TH. Localization of human immunoglobulin kappa light chain variable region genes to the short arm of chromosome 2 by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(16):4957-4961.

(37) Croce CM, Shander M, Martinis J, Cicurel L, D'Ancona GG, Dolby TW, Koprowski H. Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76(7):3416-3419.

(38) Tomlinson IM, Cook GP, Carter NP, Elaswarapu R, Smith S, Walter G, Buluwela L, Rabbitts TH, Winter G. Human immunoglobulin VH and D segments on chromosomes 15q11.2 and 16p11.2. Hum Mol Genet 1994; 3(6):853-860.

(39) Tomlinson IM, Cook GP, Walter G, Carter NP, Riethman H, Buluwela L, Rabbitts TH, Winter G. A complete map of the human immunoglobulin VH locus. Ann N Y Acad Sci 1995; 76443-6:-6.

(40) Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. J Exp Med 1998; 188(11):2151-2162.

(41) Griesser H, Tkachuk D, Reis MD, Mak TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. Blood 1989; 73(6):1402-1415.

(42) Stamatopoulos K, Kosmas C, Stavroyianni N, Belessi C, Papadaki T. Selection of immunoglobulin diversity gene reading frames in B cell lymphoproliferative disorders. Leukemia 1999; 13(4):601-604.

(43) Betz AG, Neuberger MS, Milstein C. Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. Immunol Today 1993; 14(8):405-411.

(44) Dorner T, Heimbacher C, Farner NL, Lipsky PE. Enhanced mutational activity of Vkappa gene rearrangements in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol 1999; 92(2):188-196.

(45) Lebecque SG, Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. J Exp Med 1990; 172(6):1717-1727.

(46) Cleary ML, Galili N, Trela M, Levy R, Sklar J. Single cell origin of bigenotypic and biphenotypic B cell proliferations in human follicular lymphomas. J-Exp-Med 1988; 167:582-597.

(47) Brodeur PH, Riblet R. The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse.I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes. Eur J Immunol 1984; 14(10):922-930.

(48) Mortari F, Newton JA, Wang JY, Schroeder HW. The human cord blood antibody repertoire. Frequent usage of the VH7 gene family. Eur J Immunol 1992; 22(1):241-245.

(49) Schroeder HW, Hillson JL, Perlmutter RM. Structure and evolution of mammalian VH families. Int Immunol 1990; 2(1):41-50.

(50) Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. J Immunol 1995; 155(1):190-202.

(51) Stewart AK, Huang C, Long AA, Stollar BD, Schwartz RS. VH-gene representation in autoantibodies reflects the normal human B-cell repertoire. Immunol Rev 1992; 128101-22:-22.

(52) Love VA, Lugo G, Merz D, Feeney AJ. Individual V(H) promoters vary in strength, but the frequency of rearrangement of those V(H) genes does not correlate with promoter strength nor enhancer-independence. Mol Immunol 2000; 37(1-2):29-39.

(53) Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. Cell 1981; 27(3 Pt 2):583-591.

(54) Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. kappa+lambda+ dual receptor B cells are present in the human peripheral repertoire. J Exp Med 1995; 181(3):1245-1250.

(55) Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. Science 1990; 248(4962):1517-1523.

(56) Schatz DG. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and the evolution of the adaptive immune system. Immunol Res 1999; 19(2-3):169-182.

(57) Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. Re-expression of RAG-1 and RAG-2 genes and evidence for secondary rearrangements in human germinal center B lymphocytes. Eur J Immunol 1998; 28(11):3506-3513.

(58) Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD, Bozzi F, Abinun M, Abrahamsen TG, Arkwright PD, Baniyash M, Brooks EG, Conley ME, Cortes P, Duse M, Fasth A, Filipovich AM, Infante AJ, Jones A, Mazzolari E, Muller SM, Pasic S, Rechavi G, Sacco MG, Santagata S, Schroeder ML, Seger R, Strina D, Ugazio A, Valiaho J, Vihinen M, Vogler LB, Ochs H, Vezzoni P, Friedrich W, Schwarz K. V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. Blood 2001; 97(1):81-88.

(59) Abe T, Tsuge I, Kamachi Y, Torii S, Utsumi K, Akahori Y, Ichihara Y, Kurosawa Y, Matsuoka H. Evidence for defects in V(D)J rearrangements in patients with severe combined immunodeficiency. J Immunol 1994; 152(11):5504-5513.

(60) Ramsden DA, McBlane JF, van Gent DC, Gellert M. Distinct DNA sequence and structure requirements for the two steps of V(D)J recombination signal cleavage. EMBO J 1996; 15(12):3197-3206.

(61) Cuomo CA, Mundy CL, Oettinger MA. DNA sequence and structure requirements for cleavage of V(D)J recombination signal sequences. Mol Cell Biol 1996; 16(10):5683-5690.

(62) Ramsden DA, Baetz K, Wu GE. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. Nucleic Acids Res 1994; 22(10):1785-1796.

(63) Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. EMBO J 1988; 7(13):4141-4150.

(64) Engler P, Klotz E, Storb U. N region diversity of a transgenic substrate in fetal and adult lymphoid cells. J Exp Med 1992; 176(5):1399-1404.

(65) Meier JT, Lewis SM. P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis. Mol Cell Biol 1993; 13(2):1078-1092.

(66) Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. Blood 1997; 89(1):219-226.

(67) Girschick HJ, Grammer AC, Nanki T, Mayo M, Lipsky PE. RAG1 and RAG2 expression by B cell subsets from human tonsil and peripheral blood. J Immunol 2001; 166(1):377-386.

(68) Matsuoka M, Yoshida K, Maeda T, Usuda S, Sakano H. Switch circular DNA formed in cytokinetreated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. Cell 1990; 62(1):135-142.

(69) Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Li Z, Casali P. Induction of Ig somatic hypermutation and class switching in a human monoclonal IgM+ IgD+ B cell line in vitro: definition of the requirements and modalities of hypermutation. J Immunol 1999; 162(6):3437-3447.

(70) Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94(6):1840-1847.

(71) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94(6):1848-1854.

(72) Bakkus MH, Heirman C, Van R, I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. Blood 1992; 80(9):2326-2335.

(73) Sahota S, Hamblin T, Oscier DG, Stevenson FK. Assessment of the role of clonogenic B lymphocytes in the pathogenesis of multiple myeloma. Leukemia 1994; 8(8):1285-1289.

(74) Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der DM, Wu V, Newman R, Lichtenstein AK, Berenson JR. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. J Immunol 1995; 155(5):2487-2497.

(75) Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Van Ness B. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. J Exp Med 1993; 178(3):1023-1031.

(76) Kiyoi H, Naito K, Ohno R, Saito H, Naoe T. Characterization of the immunoglobulin light chain variable region gene expressed in multiple myeloma. Leukemia 1998; 12(4):601-609.

(77) Kosmas C, Viniou NA, Stamatopoulos K, Courtenay-Luck NS, Papadaki T, Kollia P, Paterakis G, Anagnostou D, Yataganas X, Loukopoulos D. Analysis of the kappa light chain variable region in multiple myeloma. Br J Haematol 1996; 94(2):306-317.

(78) Ralph QM, Brisco MJ, Joshua DE, Brown R, Gibson J, Morley AA. Advancement of multiple myeloma from diagnosis through plateau phase to progression does not involve a new B-cell clone: evidence from the Ig heavy chain gene. Blood 1993; 82(1):202-206.

(79) Corradini P, Boccadoro M, Voena C, Pileri A. Evidence for a bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to C mu sequence in immunoglobulin (IgG)- and IgA-secreting multiple myelomas. J Exp Med 1993; 178(3):1091-1096.

(80) Bakkus MH, Van R, I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. Br J Haematol 1994; 87(1):68-74.

(81) Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 1996; 87(2):746-755. (82) Logtenberg T, Schutte ME, Inghirami G, Berman JE, Gmelig-Meyling FH, Insel RA, Knowles DM, Alt FW. Immunoglobulin VH gene expression in human B cell lines and tumors: biased VH gene expression in chronic lymphocytic leukemia. Int Immunol 1989; 1(4):362-366.

(83) Goodglick L, Braun J. Revenge of the microbes. Superantigens of the T and B cell lineage. Am J Pathol 1994; 144(4):623-636.

(84) Silverman GJ. B-cell superantigens. Immunol Today 1997; 18(8):379-386.

(85) Pascual V, Victor K, Spellerberg M, Hamblin TJ, Stevenson FK, Capra JD. VH restriction among human cold agglutinins. The VH4-21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities. J Immunol 1992; 149(7):2337-2344.

(86) Rettig MB, Vescio RA, Cao J, Wu CH, Lee JC, Han E, DerDanielian M, Newman R, Hong C,
Lichtenstein AK, Berenson JR. VH gene usage is multiple myeloma: complete absence of the VH4.21 (VH4-34) gene. Blood 1996; 87(7):2846-2852.

(87) Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. 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 1997; 99(10):2488-2501.

(88) Kraj P, Friedman DF, Stevenson F, Silberstein LE. Evidence for the overexpression of the VH4-34
(VH4.21) Ig gene segment in the normal adult human peripheral blood B cell repertoire. J Immunol 1995;
154(12):6406-6420.

(89) Kirkham PM, Schroeder HW, Jr. Antibody structure and the evolution of immunoglobulin V gene segments. Semin Immunol 1994; 6(6):347-360.

(90) Siebenlist U, Ravetch JV, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P. Human immunoglobulin D segments encoded in tandem multigenic families. Nature 1981; 294(5842):631-635.

(91) Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhammer EL, Buck D, Winter G. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. J Mol Biol 1997; 270(4):587-597.

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

(93) Mortuza FY, Moreira IM, Papaioannou M, Gameiro P, Coyle LA, Gricks CS, Amlot P, Prentice HG, Madrigal A, Hoffbrand AV, Foroni L. Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute

lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of J(H)-proximal variable gene segments. Blood 2001; 97(9):2716-2726.

(94) Witzig TE, Dhodapkar MV, Kyle RA, Greipp PR. Quantitation of circulating peripheral blood plasma cells and their relationship to disease activity in patients with multiple myeloma. Cancer 1993; 72(1):108-113.

(95) Billadeau D, Quam L, Thomas W, Kay N, Greipp P, Kyle R, Oken MM, Van Ness B. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. Blood 1992; 80(7):1818-1824.

(96) Corradini P, Voena C, Omede P, Astolfi M, Boccadoro M, Dalla-Favera R, Pileri A. Detection of circulating tumor cells in multiple myeloma by a PCR-based method. Leukemia 1993; 7(11):1879-1882.

(97) Van R, I, Heirman C, Lacor P, De Waele M, Thielemans K, Van Camp B. Detection of monoclonal B lymphocytes in bone marrow and peripheral blood of multiple myeloma patients by immunoglobulin gene rearrangement studies. Br J Haematol 1989; 73(3):289-295.

(98) Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Dolman G, Neoh SH, Peng LM, Toogood I, Morley AA. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1997; 99(2):314-319.

(99) Vescio R, Schiller G, Stewart AK, Ballester O, Noga S, Rugo H, Freytes C, Stadtmauer E, Tarantolo S, Sahebi F, Stiff P, Meharchard J, Schlossman R, Brown R, Tully H, Benyunes M, Jacobs C, Berenson R, DiPersio J, Anderson K, Berenson J. Multicenter phase III trial to evaluate CD34(+) selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma. Blood 1999; 93(6):1858-1868.

(100) Gazitt Y, Reading CC, Hoffman R, Wickrema A, Vesole DH, Jagannath S, Condino J, Lee B,
Barlogie B, Tricot G. Purified CD34+ Lin- Thy+ stem cells do not contain clonal myeloma cells. Blood 1995;
86(1):381-389.

(101) Stewart AK, Vescio R, Schiller G, Ballester O, Noga S, Rugo H, Freytes C, Stadtmauer E, Tarantolo S, Sahebi F, Stiff P, Meharchard J, Schlossman R, Brown R, Tully H, Benyunes M, Jacobs C, Berenson R, White M, DiPersio J, Anderson KC, Berenson J. Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. J Clin Oncol 2001; 19(17):3771-3779.

(102) Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E, Motta MR, Rizzi S, Terragna C, Rondelli R, Ronconi S, Curti A, Bonifazi F, Tura S, Cavo M. Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple

myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. Blood 2000; 95(7):2234-2239.

(103) Barbui AM, Galli M, Dotti G, Belli N, Borleri G, Gritti G, Bellavita P, Viero P, Comotti B, Barbui T, Rambaldi A. Negative selection of peripheral blood stem cells to support a tandem autologous transplantation programme in multiple myeloma. Br J Haematol 2002; 116(1):202-210.

(104) Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, Witzig TE. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. Blood 1996; 88(1):289-296.

(105) Billadeau D, Prosper F, Verfaillie C, Weisdorf D, Van Ness B. Sequential analysis of bone marrow and peripheral blood after stem cell transplant for myeloma shows disparate tumor involvement. Leukemia 1997; 11(9):1565-1570.

(106) Witzig TE, Gertz MA, Pineda AA, Kyle RA, Greipp PR. Detection of monoclonal plasma cells in the peripheral blood stem cell harvests of patients with multiple myeloma. Br J Haematol 1995; 89(3):640-642.

(107) Voena C, Malnati M, Majolino I, Faga G, Montefusco V, Farina L, Santoro A, Ladetto M, Boccadoro M, Corradini P. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2003; 32(8):791-793.

(108) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' ---- 3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:7276-7280.

(109) Förster VTh. Anals of Physics (Leipzig) 1948; 2:55-75.

(110) Kwok S. Procedures to minimize PCR-product carry-over. Amplifications (Perkin Elmer Cetus) 1989;(2):4.

(111) Loewy ZG, Mecca J, Diaco R. Enhancement of borrelia burgdorferi PCR by Uracil N-Glycosylase. J Clin Microbiol 1994; 32:135-138.

(112) Schuler F, Dolken SC, Hirt C, Dolken MT, Mentel R, Gurtler LG, Dolken G. No evidence for simian virus 40 DNA sequences in malignant non-Hodgkin lymphomas. Int J Cancer 2005; 118(2):498-504.

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

(114) Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Belessi C, Viniou N, Yataganas X. Molecular analysis of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Leuk Lymphoma 1999; 33(3-4):253-265.

(115) Donovan JW, Ladetto M, Zou G, Neuberg D, Poor C, Bowers D, Gribben JG. Immunoglobulin heavychain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 95(8):2651-2658.

(116) Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms EC, Pals ST, van Noesel CJ. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. Blood 2000; 95(9):2922-2929.

(117) Mortuza FY, Moreira IM, Papaioannou M, Gameiro P, Coyle LA, Gricks CS, Amlot P, Prentice HG, Madrigal A, Hoffbrand AV, Foroni L. Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of J(H)-proximal variable gene segments. Blood 2001; 97(9):2716-2726.

(118) Wasserman R, Galili N, Ito Y, Silber JH, Reichard BA, Shane S, Womer RB, Lange B, Rovera G. Residual disease at the end of induction therapy as a predictor of relapse during therapy in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1992; 10(12):1879-1888.

(119) Beishuizen A, Hahlen K, Hagemeijer A, Verhoeven MA, Hooijkaas H, Adriaansen HJ, Wolvers T, I, van Wering ER, van Dongen JJ. Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin. Leukemia 1991; 5(8):657-667.

(120) Davies FE, Rawstron AC, Owen RG, Morgan GJ. Controversies surrounding the clonogenic origin of multiple myeloma. Br J Haematol 2000; 110(1):240-241.

(121) Davies FE, Forsyth PD, Rawstron AC, Owen RG, Pratt G, Evans PA, Richards SJ, Drayson M, Smith GM, Selby PJ, Child JA, Morgan GJ. The impact of attaining a minimal disease state after high-dose melphalan and autologous transplantation for multiple myeloma. Br J Haematol 2001; 112(3):814-819.

(122) Bakkus MH, Van R, I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that the clonogenic cell in multiple myeloma originates from a pre-switched but somatically mutated B cell. Br J Haematol 1994; 87(1):68-74.

(123) Küppers R. Mechanisms of B-Cell Lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer 5. 2005: 251ff.

(124) Rasmussen T, Poulsen TS, Honore L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. Exp Hematol 2000; 28(9):1039-1045.

(125) Kosmas C, Stamatopoulos K, Loukopoulos D. Antigen selection of multiple myeloma clonogenic B cells as evidenced by V(H) and V(L) gene mutations. Blood 1997; 90(3):1334-1335.

(126) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999; 94(6):1848-1854.

(127) Corradini P, Voena C, Astolfi M, Ladetto M, Tarella C, Boccadoro M, Pileri A. High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. Blood 1995; 85(6):1596-1602.

(128) Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, Van Lint MT, Bacigalupo A, Santoro A, Musso M, Majolino I, Boccadoro M, Pileri A. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. J Clin Oncol 1999; 17(1):208-215.

(129) Swedin A, Lenhoff S, Olofsson T, Thuresson B, Westin J. Clinical utility of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement identification for tumour cell detection in multiple myeloma. Br J Haematol 1998; 103(4):1145-1151.

(130) Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Balanzategui A, Chillon MC, Alaejos I, Mateos MV, Caballero MD, Corral M, Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF. Gene scanning of VDJH-amplified segments is a clinically relevant technique to detect contaminating tumor cells in the apheresis products of multiple myeloma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2001; 28(7):665-672.

(131) Ladetto M, Donovan JW, Harig S, Trojan A, Poor C, Schlossnan R, Anderson KC, Gribben JG. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. Biol Blood Marrow Transplant 2000; 6(3):241-253.

(132) Willems P, Verhagen O, Segeren C, Veenhuizen P, Guikema J, Wiemer E, Groothuis L, Jong TB, Kok H, Bloem A, Bos N, Vellenga E, Mensink E, Sonneveld P, Lokhorst H, van Der SE, Raymakers R.
Consensus strategy to quantitate malignant cells in myeloma patients is validated in a multicenter study.
Belgium-Dutch Hematology-Oncology Group. Blood 2000; 96(1):63-70.

(133) Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin Chem 2001; 47(4):673-680.

(134) Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood 2001; 97(9):2900-2902. (135) Boccadoro M, Pileri A. Diagnosis, prognosis, and standard treatment of multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 1997; 11(1):111-131.

(136) Jacquy C, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, Vermylen C, Cornu G, Martiat P. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. Br J Haematol 1997; 98(1):140-146.

(137) Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben JG. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. Blood 1996; 88(9):3314-3322.

(138) Rasmussen T, Kastrup J, Knudsen LM, Johnsen HE. High numbers of clonal CD19+ cells in the peripheral blood of a patient with multiple myeloma. Br J Haematol 1999; 105(1):265-267.

(139) Corradini P, Voena C, Omede P, Astolfi M, Boccadoro M, Dalla-Favera R, Pileri A. Detection of circulating tumor cells in multiple myeloma by a PCR-based method. Leukemia 1993; 7(11):1879-1882.

(140) Szczepek AJ, Bergsagel PL, Axelsson L, Brown CB, Belch AR, Pilarski LM. CD34+ cells in the blood of patients with multiple myeloma express CD19 and IgH mRNA and have patient-specific IgH VDJ gene rearrangements. Blood 1997; 89(5):1824-1833.

(141) Kay NE, Leong T, Kyle RA, Greipp P, Billadeau D, Van Ness B, Bone N, Oken MM. Circulating blood B cells in multiple myeloma: analysis and relationship to circulating clonal cells and clinical parameters in a cohort of patients entered on the Eastern Cooperative Oncology Group phase III E9486 clinical trial. Blood 1997; 90(1):340-345.

(142) Witzig TE, Gertz MA, Lust JA, Kyle RA, O'Fallon WM, Greipp PR. Peripheral blood monoclonal plasma cells as a predictor of survival in patients with multiple myeloma. Blood 1996; 88(5):1780-1787.

(143) Kiel K, Cremer FW, Rottenburger C, Kallmeyer C, Ehrbrecht E, Atzberger A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Moos M. Analysis of circulating tumor cells in patients with multiple myeloma during the course of high-dose therapy with peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 1999; 23(10):1019-1027.

(144) Rawstron AC, Owen RG, Davies FE, Johnson RJ, Jones RA, Richards SJ, Evans PA, Child JA, Smith GM, Jack AS, Morgan GJ. Circulating plasma cells in multiple myeloma: characterization and correlation with disease stage. Br J Haematol 1997; 97(1):46-55.

(145) Rawstron AC, Davies FE, DasGupta R, Ashcroft AJ, Patmore R, Drayson MT, Owen RG, Jack AS, Child JA, Morgan GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. Blood 2002; 100(9):3095-3100.

(146) Rottenburger C, Kiel K, Bosing T, Cremer FW, Moldenhauer G, Ho AD, Goldschmidt H, Moos M. Clonotypic CD20+ and CD19+ B cells in peripheral blood of patients with multiple myeloma post high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation. Br J Haematol 1999; 106(2):545-552.

(147) Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K, Pruski E, Coupland RW, Belch AR. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. Blood 2000; 95(3):1056-1065.

(148) Lemoli RM, Cavo M, Fortuna A. Concomitant mobilization of plasma cells and hematopoietic progenitors into peripheral blood of patients with multiple myeloma. J Hematother 1996; 5(4):339-349.

(149) Henry JM, Sykes PJ, Brisco MJ, To LB, Juttner CA, Morley AA. Comparison of myeloma cell contamination of bone marrow and peripheral blood stem cell harvests. Br J Haematol 1996; 92(3):614-619.

(150) Tricot G, Gazitt Y, Leemhuis T, Jagannath S, Desikan KR, Siegel D, Fassas A, Tindle S, Nelson J, Juttner C, Tsukamoto A, Hallagan J, Atkinson K, Reading C, Hoffman R, Barlogie B. Collection, tumor contamination, and engraftment kinetics of highly purified hematopoietic progenitor cells to support high dose therapy in multiple myeloma. Blood 1998; 91(12):4489-4495.

(151) Vescio RA, Han EJ, Schiller GJ, Lee JC, Wu CH, Cao J, Shin J, Kim A, Lichtenstein AK, Berenson JR. Quantitative comparison of multiple myeloma tumor contamination in bone marrow harvest and leukapheresis autografts. Bone Marrow Transplant 1996; 18(1):103-110.

(152) Mitterer M, Oduncu F, Lanthaler AJ, Drexler E, Amaddii G, Fabris P, Emmerich B, Coser P, Straka C. The relationship between monoclonal myeloma precursor B cells in the peripheral blood stem cell harvests and the clinical response of multiple myeloma patients. Br J Haematol 1999; 106(3):737-743.

(153) Attal M, Harousseau JL. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma.Hematol Oncol Clin North Am 1997; 11(1):133-146.

(154) Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, Van Lint MT, Bacigalupo A, Santoro A, Musso M, Majolino I, Boccadoro M, Pileri A. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. J Clin Oncol 1999; 17(1):208-215.

(155) Esteve J, Villamor N, Colomer D, Cervantes F, Campo E, Carreras E, Montserrat E. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. Leukemia 2001; 15(3):445-451.

(156) Provan D, Bartlett PL, Zwicky C, Neuberg D, Maddocks A, Corradini P, Soiffer R, Ritz J, Nadler LM, Gribben JG. Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. Blood 1996; 88(6):2228-2235.

(157) Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, Valagussa P, Boccadoro M, Samson D, Bacigalupo A, Russell N, Montefusco V, Voena C, Gahrton G. Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. Blood 2003; 102(5):1927-1929.

(158) Bensinger WI, Buckner CD, Anasetti C, Clift R, Storb R, Barnett T, Chauncey T, Shulman H, Appelbaum FR. Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. Blood 1996; 88(7):2787-2793.

(159) Gahrton G, Tura S, Ljungman P, Blade J, Brandt L, Cavo M, Facon T, Gratwohl A, Hagenbeek A, Jacobs P, . Prognostic factors in allogeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma. J Clin Oncol 1995; 13(6):1312-1322.

(160) Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, Hermans J, Alegre A, Apperley J, Blade J, Carlson K, Cavo M, Ferrant A, Goldstone AH, De Laurenzi A, Majolino I, Marcus R, Prentice HG, Remes K, Samson D, Sureda A, Verdonck LF, Volin L, Gahrton G. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Blood 1996; 88(12):4711-4718.

(161) Cavo M, Terragna C, Martinelli G, Ronconi S, Zamagni E, Tosi P, Lemoli RM, Benni M, Pagliani G, Bandini G, Tura S. Molecular monitoring of minimal residual disease in patients in long-term complete remission after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. Blood 2000; 96(1):355-357.

(162) Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, Thomas LL, Verdonck LF. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. Blood 1997;
 90(10):4206-4211.

(163) Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ, van Oers MH, Fibbe W, Russell I, Donk NW, Verdonck LF. Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. J Clin Oncol 2000; 18(16):3031-3037. (164) Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B. Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. Blood 1996; 87(3):1196-1198.

(165) Verdonck LF, Lokhorst HM, Dekker AW, Nieuwenhuis HK, Petersen EJ. Graft-versus-myeloma effect in two cases. Lancet 1996; 347(9004):800-801.

(166) Richardson PG. Bortezomib: a novel therapy approved for multiple myeloma. Clin Adv Hematol Oncol 2003; 1(10):596-600.

(167) Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and dexamethasone: therapy for multiple myeloma. Expert Rev Anticancer Ther 2005; 5(5):759-766.

Zusammenfassung

Nachweis von Myelomzellen durch CDRIII-klonspezifische real-time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum Nachweis von Tumorzellen beim multiplen Myelom eine PCR-Methode getestet, die mit Hilfe der tumorklonspezifischen rekombinierten Immunglobulinsequenzen eine hochspezifische Gensequenz als Nachweisziel hat. Diese Methode kann zur Verlaufskontrolle, zur Therapieevaluation und zur Tumornachsorge genutzt werden. Zur Identifikation des Klons wurden VH-Familien-spezifische Primer für die höher konservierten Bereiche der Leader- und FR3-Region sowie für die JH- und C-Region verwendet. Dieser PCR-Ansatz wurde im Vorfeld bei Patienten mit CLL bereits etabliert. Insgesamt konnte bei 20 von 26 untersuchten Myelompatienten das VDJ-Genrearrangement bestimmt und der jeweils beteiligten VH-Familie zugeordnet werden. Wegen der vermutlich zu stark mutierten Gensequenz war bei sechs Patienten die Identifikation des Myelomklons nicht möglich.

Da in der Agarosegelelektrophorese bei einigen Patienten zusätzliche schwache, unklar abgrenzbare Banden zu sehen waren wurde an ausgewählten Patienten ein Gen-Scan durchgeführt, der die schwer abgrenzbaren Banden als Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Größe identifizierte. Vermutlich handelt es sich hierbei um die Rearrangements weiterer B-Zell-Subpopulationen.

Von 18 Myelomklonen wurden 17 erfolgreich sequenziert und analysiert. Bei einem Klon konnte trotz mehrerer Versuche keine eindeutige Sequenz bestimmt werden. Eine eindeutige Festlegung des beteiligten VH-Gens war aufgrund gleichrangiger Homologie im Genbankvergleich bei sieben Patienten nicht möglich. In den Sequenzanalysen wurde mit einer durchschnittlichen Mutationsrate von 0,092 eine hohe Anzahl somatischer Mutationen nachgewiesen, wodurch der Anteil der nicht analysierbaren Myelomklone erklärt werden kann.

Nach Synthese und Kontrolle der Tumorklon-spezifischen ASO-Primer sowie Optimierung der Taqman-Sonden wurden bei zwei klinisch interessanten Patienten Verlaufskontrollen durchgeführt, bei denen sowohl Knochenmark als auch Blut untersucht wurde.

Die quantitative ASO-PCR bietet sich als hochspezifisches Verfahren, das die Tumorzelle direkt nachweist, an, Patienten in kompletter Remission zu überwachen und mittels eines MRD-Monitorings zu verfolgen. Die Sensitivität des Ansatzes übertrifft die klassischen Nachweismethoden bei weitem. Besonders Risikopatienten nach allogener oder autologer Transplantation könnten unter Umständen von einer sensitiveren Tumordiagnostik profitieren.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, daß ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und daß eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 09.02.2006

Volker Koberstein

Lebenslauf

Persönliche Daten

Anschrift	Volker Koberstein Brüggstr. 1b 17489 Greifswald Telefon: 03834/898615 Email: <u>volkerkoberstein@uni-greifswald.de</u>
Familienstand Geburtsdatum	ledig 07.09.1976 in Paderborn
Studium	
Seit Okt 1997	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Studium der Humanmedizin
Sept 1999	Ärztliche Vorprüfung
Sept 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt 2002	Freisemester zum Zwecke der Promotion
Seit April 2003	 Praktisches Jahr (E.M.AUniversität Greifswald) 1. Tertial: Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin 2. Tertial: Klinik für Chirurgie/Unfallchirurgie 3. Tertial: Klinik für Innere Medizin C, Hämatologie/Onkologie
25. Mai 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab 01. Aug 2004	Beschäftigung als Arzt i.P. Klinikum der EMAUniversität Greifswald Klinik für Innere Medizin C, Hämatologie/ Onkologie Transplantationszentrum Direktor: Prof. Dr. med. Gottfried Dölken
Ab 01. Okt 2004	Beschäftigung als Assistenzarzt Klinikum der EMAUniversität Greifswald Klinik für Innere Medizin C, Hämatologie/ Onkologie Transplantationszentrum Direktor: Prof. Dr. med. Gottfried Dölken

Promotion	Thema: Nachweis von Myelomzellen durch CDRIII- klonspezifische real-time-PCR
Schulbildung	

Aug 1987- Juli 1996	Pelizaeus-Gymnasium Paderborn
	Abschluss: Abitur

Zusätzliche Qualifikationen und Tätigkeiten

Juli 1996- Aug 1997	Zivildienst DRK-Rettungswache, Bad Lippspringe Ausbildung zum Rettungssanitäter
Okt 99- Sept 2001	Institut für Anatomie
	Tutor im anatomischen Präparierkurs
	Mitarbeit an der Neuauflage eines Lehrbuches
	(Waldeyer: Anatomie)

Greifswald, 09.02.2006

Danksagung

Ich danke meinem "Doktorvater" Herrn Prof. Dr. Gottfried Dölken, der bei mir durch diese Arbeit das Interesse für die Molekularbiologie und für wissenschaftliches Arbeiten geweckt hat. Bei allen auftretenden Problemen stand er mir mit seinen Ideen, seiner ansteckenden Begeisterung und seiner Zeit für Diskussionen zur Seite.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Frank Schüler. Mit unendlicher Geduld hat er mir bei der Bewältigung sämtlicher Laborprobleme geholfen. Die hervorragende Einarbeitung in die verschiedenen Programme und die Bedienung der technischen Geräte habe ich ihm zu verdanken. Kein noch so widerspenstiger Computer, der Frank Schüler lange Widerstand leisten konnte.

Bei Ute Pett und Kerstin Gumm möchte ich mich für die Hilfe bei der Präparation von Zellen und DNA sowie für ihre Unterstützung beim Erlernen verschiedener Labortechniken bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Freundin Petra Vogts, die mir mit ihrer liebevollen Fürsorge und ihren Motivationskünsten die trockenen Stunden vorm Computer beim Schreiben der Arbeit erleichtert hat.

Volker Koberstein