



Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

Quantitative „real-time“ PCR bei Patienten mit folliculärem Lymphom und kombinierter Chemo-Immuntherapie mit Rituximab

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der
Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Fischer

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. W. H. M. Raab
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Kronenwett
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. U. Warskulat

gewidmet meiner Familie

	Abkürzungsverzeichnis.....	7
1.	EINLEITUNG.....	9
1.1	Das folliculäre Lymphom.....	9
1.1.1	Epidemiologie und Klinik.....	9
1.1.2	Pathogenese und Molekularbiologie.....	10
1.1.3	Therapie und Prognose.....	12
1.2	Molekulares Monitoring durch PCR.....	17
1.2.1	Allgemeines.....	17
1.2.2	Qualitative „nested“ PCR.....	17
1.2.3	Quantitative „real-time“ PCR (RQ-PCR).....	18
1.2.4	Bedeutung des molekularen Monitoring für die Diagnostik und Therapie hämatologischer Neoplasien.....	20
1.2.5	Bedeutung des Nachweises der t(14;18)-Translokation durch PCR für die Therapie und Prognose des folliculären Lymphoms.....	21
1.3	Studienziele.....	23
2.	PATIENTEN UND METHODEN.....	24
2.1	Patienten.....	24
2.1.1	Einschlusskriterien.....	24
2.1.2	Therapie.....	24
2.1.3	Remissionskriterien.....	28
2.2	Zellen.....	29
2.2.1	Arbeitsschritte.....	29
2.2.2	Probenentnahme.....	30
2.2.3	Dichtegradientenzentrifugation.....	30
2.2.4	DNA-Extraktion.....	31
2.2.5	Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	33

2.3	„Nested“ PCR.....	35
2.3.1	Qualitative t(14;18)-spezifische PCR.....	35
2.3.2	Agarosegel-Elektrophorese.....	36
2.4	Quantitative „real-time“ PCR.....	37
2.4.1	Aufbau des LightCyclers®.....	37
2.4.2	Quantitative t(14;18)-spezifische PCR.....	38
2.4.3	Relative Quantifizierung.....	40
2.5	Statistische Auswertung.....	41
3.	ERGEBNISSE.....	42
3.1	Eigenschaften der t(14;18)-spezifischen quantitativen „real-time“ PCR mit dem LightCycler®.....	42
3.1.1	Sensitivität der RQ-PCR.....	42
3.1.2	Linearer Messbereich.....	46
3.1.3	Grenze der Quantifizierung.....	47
3.1.4	Intra- und Inter-Test-Variabilität.....	48
3.2	Klinische Evaluation der RQ-PCR mit dem LightCycler®.....	49
3.2.1	Quantifizierung der t(14;18)-positiven Zellen im KM und PB von Patienten mit follikulärem Lymphom.....	49
3.2.2	Krankheitsstatus und Patientencharakteristika in Bezug auf die Mengen t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB.....	51
3.2.2.1	Zusammenhang mit Krankheitsphase und Remissionsstatus.....	51
3.2.2.2	Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium.....	53
3.2.2.3	Zusammenhang mit dem Geschlecht.....	54
3.2.2.4	Zusammenhang mit einer „bulky disease“.....	54
3.2.2.5	Zusammenhang mit der KM-Morphologie.....	54
3.2.3	Serielles molekulares Monitoring durch t(14;18)-RQ-PCR während der Therapie von Patienten mit follikulärem Lymphom.....	57
3.2.3.1	Therapie der Patienten mit Erstdiagnose.....	57
3.2.3.2	Therapie der Patienten mit Rezidiv.....	60

4. DISKUSSION.....	62
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	68
Literaturverzeichnis.....	70
Curriculum vitae.....	81
Danksagung.....	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABSZT	Autologe Blutstammzelltransplantation
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
BEAM	Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan
Bcl-2-Proto-Onkogen	B-cell-lymphoma-2-Proto-Onkogen
Bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
CD	„cluster of differentiation“
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydauromycin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin), Prednison
CML	chronische myeloische Leukämie
CP	“crossing point”
CR	“complete remission”
DNA	“desoxyribonucleic acid”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	„Federal Drug Administration“
FM	Fludarabin, Mitoxantron
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G-CSF	„granulocyte colony-stimulating factor“
HAM	Hochdosis Cytarabin, Mitoxantron
HTLV	„Human T-cell-leucaemia-virus“
i.v.	Intravenös
IFN- α	Interferon-alpha
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
LC	LightCycler [®]
LC-Rot 640	LightCycler [®] -Rot 640
MBR	“major breakpoint region”
Mcr	„minor cluster region“

MNC	“mononuclear cells”
MRD	“minimal residual disease”
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
p	kurzer Arm des Chromosoms
PB	peripheres Blut
PBS	„phosphate buffered saline“
PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	„polymerase chain reaction“
PR	partielle Remission
q	langer Arm des Chromosoms
RNA	„ribonucleic acid“
rpm	Rotationen pro Minute
RQ-PCR	quantitative „real-time“ PCR
RT	reverse Transkription
s.	Siehe
VDJ-Rearrangement	Rekombination aus variabler Sequenz, Diversitätssegment und Joining-Sequenz
vgl.	Vergleiche
z.B.	Zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Das folliculäre Non-Hodgkin-Lymphom

1.1.1 *Epidemiologie und Klinik*

Folliculäre Lymphome gehören zu den häufigsten Lymphomen in der westlichen Welt und machen etwa 30% der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus. In Deutschland beträgt die Inzidenz sieben bis zehn Neuerkrankungen jährlich pro 100.000 Einwohner und ist in den letzten drei Dekaden stark angestiegen. In den USA wurde in den vergangenen 20 Jahren eine nahezu dreifache Steigerung der Erkrankungsrate beobachtet. Die bei Männern und Frauen gleich häufig festgestellten folliculären Lymphome treten im mittleren bis höheren Lebensalter auf (medianes Diagnosealter 60 Jahre) und sind durch ein langsames, disseminiertes Wachstum gekennzeichnet.

Trotz ungeklärter Ätiologie weisen epidemiologische Untersuchungen darauf hin, dass Pestizide, Lösungsmittel, Baumwollstaubpartikel, aber auch Staub und Haarfärbemittel zu den krankheitsbegünstigenden oder sogar kausalen Faktoren zählen¹.

Das folliculäre Lymphom gehört zu den Lymphomen niedriger Malignität, die in der amerikanischen Literatur auch als indolent bezeichnet werden. Erst 1999 erfolgte eine einheitliche Einteilung in Form der international anerkannten neuen WHO (World Health Organization)-Klassifikation², die auf der REAL (Revised European American Lymphoma)-Klassifikation³ aufbaut und Unklarheiten beseitigt, die aufgrund der nicht kompatiblen und somit konkurrierenden Klassifikationsversuche zuvor aufgetreten waren. Dieser Einteilung liegen morphologische, immunologische, zytogenetische, molekularbiologische und klinische Befunde zugrunde. Sie teilt die folliculären Lymphome anhand des Prozentsatzes blastärer Zellen im Tumor in Grad I, II und III ein. Die folliculären Lymphome Grad I und II entsprechen dem zentroblastisch-zentrozytischen Lymphom, während das folliculäre Lymphom Grad III in der Kiel-Klassifikation^{4,5} als zentroblastisches Lymphom bezeichnet wurde.

Das klinische Bild wird im wesentlichen von drei Symptomenkomplexen bestimmt: Vergrößerung von Lymphknoten, Leber oder Milz, Knochenmarkinfiltration mit Verdrängung der normalen Hämatopoese sowie B-Symptome (Fieber über 38°C, Nachtschweiß, Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichts in sechs Monaten). In den frühen Stadien werden charakteristischerweise am häufigsten zervikale, axilläre und inguinale Lymphknoten befallen, mediastinaler Lymphknotenbefall und leukämische Ausschwemmung sind dagegen selten. Typisch für den klinischen Verlauf der folliculären Lymphome ist eine Progredienz über Jahre bis Jahrzehnte.

1.1.2. Pathogenese und Molekularbiologie

Die folliculären Non-Hodgkin-Lymphome sind eine Neoplasie der Keimzentren, die von einer einzelnen, klonal expandierenden Zelle des lymphatischen Systems ausgeht. Die knotenförmigen Ausbreitungen der Tumorzellen folgen einem folliculären Wachstumsmuster und verdrängen die normale Lymphknotenstruktur (Abb. 1).

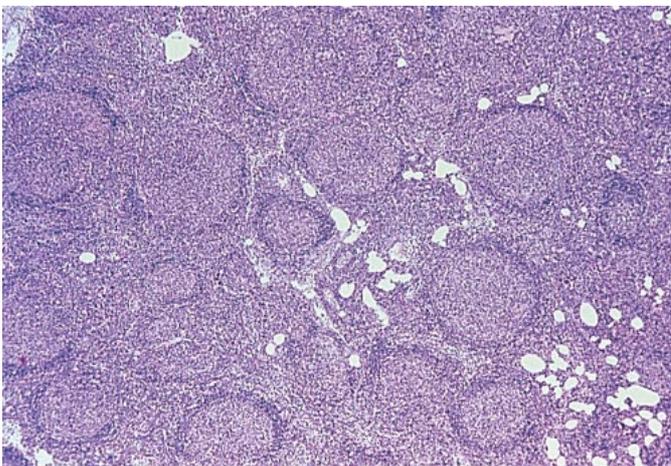


Abbildung 1: Follikuläres Lymphom in einem Lymphknoten. HE-Färbung bei Übersichtsvergrößerung: Das Lymphom imitiert mit seinem folliculären Wachstum reaktive Keimzentren.

Chromosomale Translokationen mit Beteiligung der Immunglobulinschwerkettengene und des „B-cell-lymphoma-2“ (*bcl-2*)-Proto-Onkogens sind wahrscheinlich die primären Ereignisse, die zusammen mit weiteren bisher nicht identifizierten genetischen Veränderungen zur Entstehung dieser Neoplasie führen⁶. Bei etwa 80% der Patienten ist eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomensegmenten 14q32

und 18q21 nachweisbar⁷. Dadurch kommt es zu einer Fusion des auf Chromosom 18 lokalisierten antiapoptotischen Gens *bcl-2* mit dem auf Chromosom 14

lokalisierten Gen (J_H -Segment) für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH)⁸ (Abb. 2a)

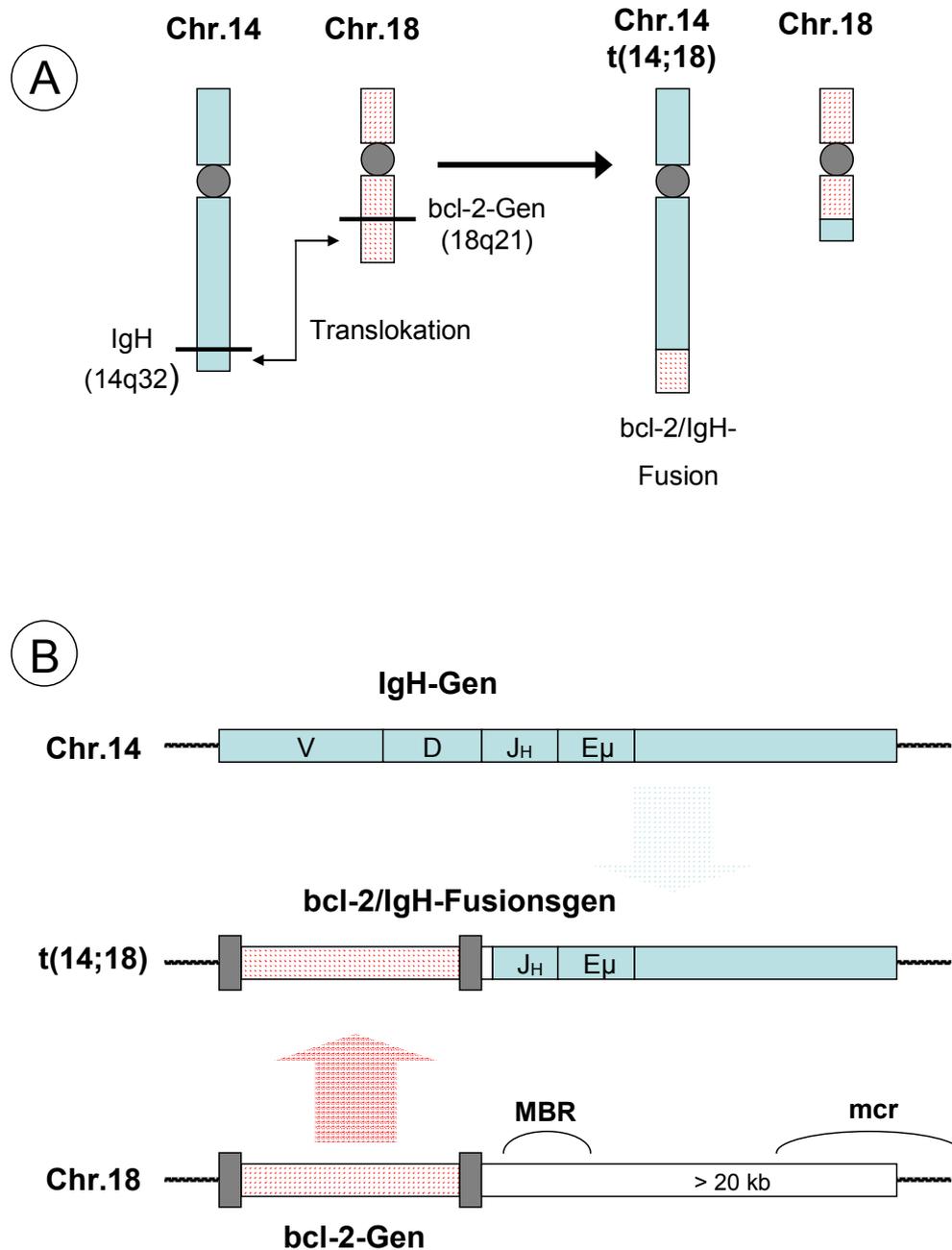


Abbildung 2: Die Translokation t(14;18). **(A)** Schematische Darstellung der reziproken Translokation zwischen Chromosomen 14 und 18. **(B)** Schematische Darstellung der VDJ-Region des Ig-Schwerkettengens auf Chromosom 14, des *bcl-2*-Gens auf Chromosom 18 sowie der *bcl-2/IgH*-Fusion als Folge der Translokation. Die Lokalisationen der MBR und der mcr auf Chromosom 18 sind eingezeichnet.

Es sind zwei verschiedene Bruchpunktregionen innerhalb des *bcl-2*-Gens auf Chromosom 18 bekannt. Die erste sogenannte „Major breakpoint region“ (MBR) ist ein 150 bp großes Segment der 3' untranslatierten Region auf Exon 3 des *bcl-2* Gens. Ungefähr 70% der Bruchpunkte auf Chromosom 18 sind in dieser Region anzutreffen. Der zweite Bruchpunkt ist die sogenannte „Minor cluster region“ (mcr)⁹. Da beide Bruchpunktregionen außerhalb der kodierenden Region des *bcl-2*-Gens liegen, bleibt das Genprodukt trotz Translokation unverändert. In seltenen Fällen können Bruchpunkte auch außerhalb von MBR und mcr nachgewiesen werden¹⁰. Auf Chromosom 14 liegt der Bruchpunkt am 5' Ende einer der sechs J_H Segmente des humanen IgH Lokus (Abb. 2b).

Diese Umstellung bringt den starken „E μ -Enhancer“ des IgH-Lokus in räumliche Nähe zum *bcl-2*-Promotor¹¹. Es wird vermutet, dass dadurch die BCL-2-Protein-Expression auf Transkriptionsebene hochreguliert wird¹². BCL-2 ist ein zellzyklusregulatorisches, Apoptose-hemmendes Protein, welches durch das Wechselspiel mit seinem Antagonisten BAX (BCL-2-assoziiertes X Protein) das Absterben und das Überleben von normalen Lymphozyten im Follikelzentrum reguliert¹³. Translokation-tragende B-Zellen mit BCL-2-Überexpression haben somit durch die Hemmung der Apoptose einen Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen und akkumulieren klonartig¹⁴. Die Überexpression ist indes auch mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Zytostatika (Anthrazykline) und Kortikosteroiden verbunden¹⁵. Noch ist nicht geklärt, welche weiteren Faktoren zur Krankheitsentstehung beitragen, denn auch bei gesunden Probanden lässt sich in seltenen Fällen eine kleine Population t(14;18)-positiver Zellen nachweisen¹⁶.

1.1.3 Therapie und Prognose

Die Therapie richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung. In den lokal begrenzten Stadien I und II nach Ann-Arbor¹⁷ ist eine Strahlentherapie in der Lage, eine lang andauernde Krankheitsfreiheit und potentielle Heilung zu erzielen. Allerdings befinden sich etwa 80% der Patienten bei Diagnosestellung schon in den fortgeschrittenen, disseminierten Stadien III und IV, in denen die Behandlung in palliativer Intention mit dem Ziel der Lebensverlängerung und Symptomkontrolle erfolgt. Bei geringer Progredienz ist in diesen Stadien eine abwartende Haltung

gerechtfertigt. B-Symptome, hämatopoetische Insuffizienz sowie ein progredientes Lymphknoten-Wachstum machen jedoch einen Therapiebeginn notwendig.

Die derzeitige Standardtherapie beinhaltet eine initiale zytoreduktive Chemotherapie und nach Erreichen einer partiellen oder kompletten Remission eine langfristige Erhaltungstherapie mit Interferon-alpha. Trotz einer initial hohen Ansprechrate ist der klinische Verlauf von wiederholten Rezidiven gekennzeichnet. Viele Patienten werden therapierefraktär oder entwickeln ein großzelliges B-Zell-Lymphom¹⁸. Seit Mitte der achtziger Jahre wird auch bei Lymphomen der Einsatz einer myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie mit Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen untersucht¹⁹⁻²¹. Der oft indolente Verlauf der Erkrankung und das hohe mediane Alter der Patienten sprachen bis vor einigen Jahren gegen eine solche intensive Behandlung. Durch die relative Zunahme des Anteils jüngerer Patienten (<55 Jahre) mit hohem Risiko für Krankheitsprogress sowie durch die Verbesserung der supportiven Maßnahmen wurde die Hochdosistherapie mit peripherer Stammzelltransplantation jedoch zunehmend bedeutsam. Der Vorteil der Transplantation autologer Stammzellen aus dem peripheren Blut gegenüber Stammzellen aus dem Knochenmark liegt nicht nur in der für den Patienten risikoärmeren Gewinnungsmethode, sondern auch in der rascheren hämatopoetischen Rekonstitution und der damit verbundenen geringeren Rate an Infektkomplikationen. Noch ist unklar, ob damit die Erkrankung geheilt werden kann, da Rezidive auch nach mehreren Jahren noch von residualen Lymphomzellen ausgehen können. Dennoch verbesserten Hochdosistherapie und Transplantation signifikant die Prognose von Patienten mit follikulärem Lymphom im fortgeschrittenen Stadium, insbesondere wenn die Transplantation während des frühen Krankheitsverlaufs stattfand^{19,22}.

Der Gedanke einer gezielten Aktivierung des Immunsystems zur effektiven Bekämpfung maligner Erkrankungen wurde erstmals vor 100 Jahren von Coley geäußert und in ersten Versuchen bei Patienten bestätigt²³. Erst durch die rasch zunehmende Kenntnis der molekularen und immunologischen Mechanismen, die zur Entstehung der Lymphome führen, wurde die wissenschaftliche Basis für die Durchführung immuntherapeutischer Studien geschaffen. Ziel ist die Aktivierung des Immunsystems, um maligne Zellen zu zerstören. Tumorassoziierte Antigene induzieren meistens nur eine schwache Immunabwehr, da sie selten sogenannte Neoantigene darstellen, sondern zumeist physiologisch vorkommende, auf

normalen Zellen exprimierte Antigene²⁴ sind. Um gegen solche Antigene eine suffiziente Immunantwort zu induzieren, muss die vorhandene immunologische Toleranzschwelle, beispielsweise mittels monoklonaler Antikörper, durchbrochen werden. Monoklonale Antikörper, erstmals 1975 von Köhler und Milstein hergestellt²⁵, sollen im Rahmen einer passiven Immuntherapie im Patienten spezifisch Tumorzellen auffinden und zerstören.

Eine neue, auf monoklonalen Antikörpern basierende Behandlungsoption bei Non-Hodgkin-Lymphomen stellt die Anwendung des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab (MabThera[®]) dar. MabThera[®] ist der erste monoklonale Antikörper, der von der Federal Drug Administration (FDA) für die Krebstherapie zugelassen wurde. Der gentechnisch hergestellte, zu einem Großteil "humanisierte" Antikörper, enthält nur noch die variable, für die Antigenerkennung zuständige Region des Mausantikörpers (Abb. 3). Die konstanten Kappa-Regionen des Mausantikörpers sind gegen diejenigen des Menschen ausgetauscht (IgG₁)²⁶. Daher treten humane Anti-Maus-Antikörper oder humane Anti-Chimera-Antikörper nahezu nie auf.

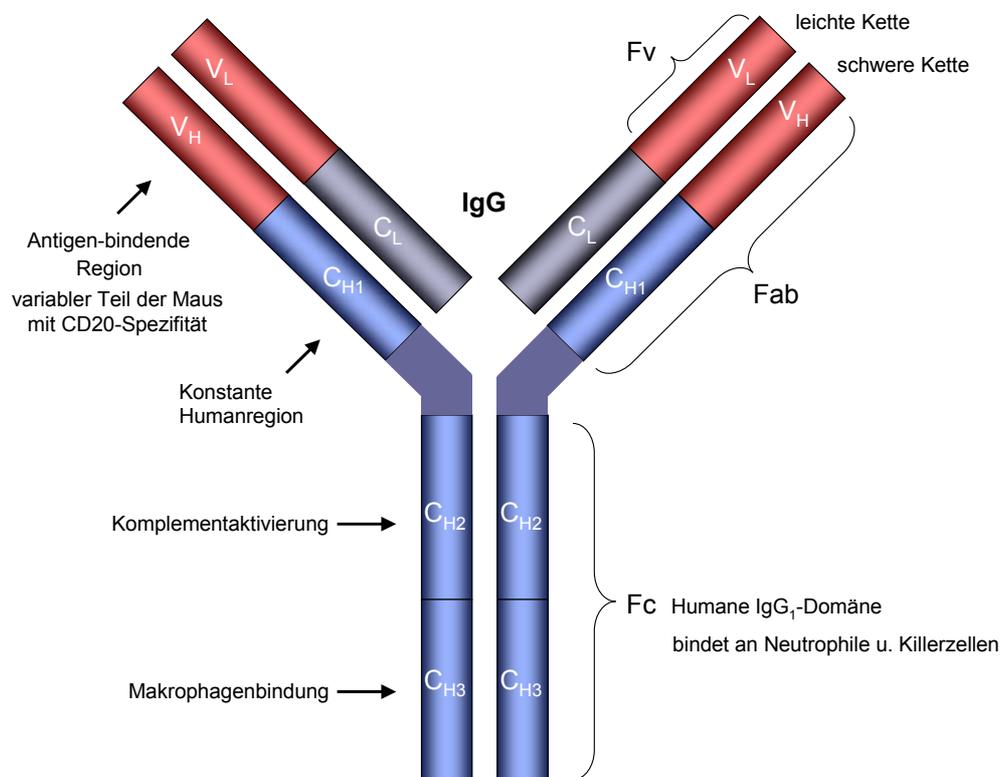


Abbildung 3: Struktur des chimären Mensch/Maus-Antikörpers Rituximab.

Fv = variables Fragment; Fab = antigenbindendes Fragment; Fc = „crystalline“ Fragment
Die murinen Anteile sind rot, die des Menschen blau markiert.

Die gezielte Antikörpertherapie richtet sich selektiv gegen das B-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD20 („cluster of differentiation“), das auf 95% aller malignen Non-Hodgkin Lymphome aber auch auf normalen reifen B-Lymphozyten exprimiert wird²⁷. Das CD20-Molekül ist ein membranassoziertes Phosphoprotein, das als Kalziumkanal fungiert, intrazelluläre Signale initiiert sowie das G₁/S-Zellzykluswachstum moduliert^{28,29}. Es stellt ein ideales Ziel für die an die Zelle andockenden Anti-CD20-Antikörper dar und reagiert auf diese Antikörper-Bindung weder mit Herabregulierung noch mit Zerfall^{26,29}. Nach Bindung an der Tumorzelle entfaltet Rituximab seine Wirkung im wesentlichen über drei Mechanismen. Dazu zählt die Aktivierung körpereigener Abwehrsysteme wie komplementvermittelte Lyse (CDC, „complement-mediated cytotoxicity“)³⁰, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, „antibody dependent cellular cytotoxicity“, „natural killer cells“)³¹ sowie Induktion von Apoptose^{32,33}. In der Folge wird die gesamte B-Lymphozyten-Population in Blut, Knochenmark und Lymphknoten um etwa 80% reduziert. Auch die entarteten Zellen werden dadurch zu einem Großteil vernichtet. Die lymphatischen CD34-positiven Vorläuferzellen, aus denen alle Lymphozyten entstehen (Abb. 4), werden vom Antikörper-Angriff verschont, da sie nicht das CD20-Oberflächenprotein tragen, so dass innerhalb einiger Wochen wieder reife gesunde B-Zellen vorliegen.

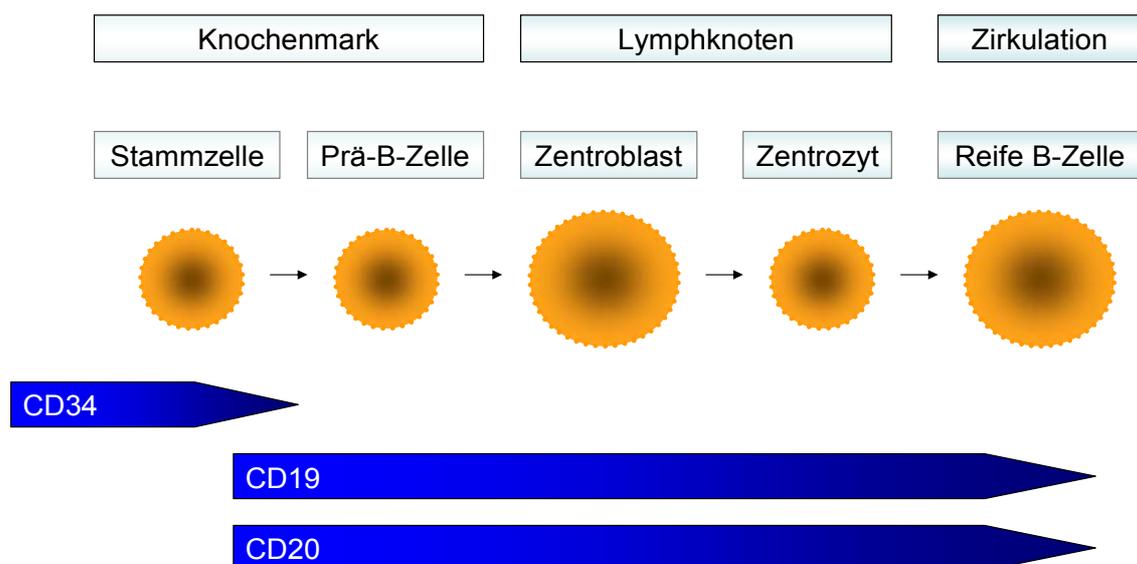


Abbildung 4: Entwicklungsstadium-abhängige Antigen-Expression bei B-Zellen.

Klinische Versuche, in denen Rituximab als alleiniges Mittel benutzt wurde, zeigten bei guter Verträglichkeit eine zügige, Antikörper-vermittelte Depletion CD20-positiver, normaler B-Zellen und Lymphomzellen mit Ansprechraten zwischen 32% und 62% bei Patienten mit rezidiviertem follikulärem Lymphom, Mantelzelllymphom oder diffusem Riesenzelllymphom³⁴⁻³⁸. Die hohen Ansprechraten bei Chemotherapie-refraktären Patienten und das günstige Toxizitätsprofil förderten die Verwendung von Rituximab als Primärtherapie bei Patienten mit niedrig malignem NHL. Nach der initialen Antikörper-Monotherapie beobachteten Hainsworth et al. in einem 41 Patienten umfassenden Kollektiv Remissionsraten von bis zu 65%, davon 23% in kompletter Remission³⁹. Ähnliche Resultate wurden im Rahmen eines Hochdosis-Therapieprotokolls erzielt⁴⁰. In dieser Studie konnten durch die Gabe des Antilymphom-Antikörpers vor Chemotherapie mit G-CSF („granulocyte colony-stimulating factor“) -unterstützter Blutstammzellmobilisierung bei sieben untersuchten Patienten in keinem der Leukaphereseprodukte t(14;18)-positive Zellen mehr nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die Antikörpertherapie einer In-vivo-Tumorzelldepletion entspricht. Experimentelle und klinische Daten deuten darauf hin, dass Rituximab und die gewählten Chemotherapeutika synergistisch wirken und resistente Zellen gegenüber der Chemotherapie sensibilisiert werden. In der Tat zeigten sich zuvor resistente Lymphomzellen nach der In-vitro-Behandlung mit dem Anti-CD20-Antikörper sensitiver gegenüber zytotoxischen Substanzen⁴¹.

Für Patienten mit follikulärem Lymphom in den fortgeschrittenen Stadien III und IV beträgt die mediane Überlebenszeit fünf bis acht Jahre und es existiert bis heute kein gesichertes kuratives Therapiekonzept. Prognosefaktoren, die sich ungünstig sowohl auf das rezidivfreie - als auch auf das Gesamtüberleben auswirken, sind eine hohe Tumorlast, eine leukämische Ausschwemmung, Hepatosplenomegalie, eine erhöhte Serum-Laktat-Dehydrogenase sowie fortgeschrittenes Alter.

1.2 Molekulares Monitoring durch PCR

1.2.1 *Allgemeines*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der zyklischen In-vitro-Vermehrung spezifischer Nukleotidsequenzen. Jeder Zyklus besteht aus dem thermischen Auftrennen der doppelsträngigen DNA-Vorlagen (Denaturierung), dem Anlagern der Primer („Annealing“) und der nachfolgenden DNA-Synthese („Extension“) durch eine temperaturstabile DNA-Polymerase, z.B. der Taq-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium „*Thermophilus aquaticus*“). Aufgrund der exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA („Template“) verfügt diese rasch durchführbare Methode über eine hohe Sensitivität und ergänzt damit die klassischen Blot-Methoden. Besonders geeignet ist sie zum Nachweis tumorzellspezifischer Sequenzen wie z.B. Translokationen (t(14;18) beim folliculären Lymphom) und wird daher bei Neoplasien zunehmend für Verlaufsuntersuchungen eingesetzt. Sowohl qualitativ als auch quantitativ gelingt dabei der Nachweis residualer Tumorzellen, die im Rahmen einer „minimal residual disease“ (MRD) -Diagnostik Rückschlüsse auf die Krankheitsaktivität sowie den Therapieverlauf zulassen.

1.2.2 *Qualitative „nested“ PCR*

Zum Nachweis einer minimalen Resterkrankung eignet sich die „nested“ PCR. Hierbei wird in zwei hintereinander geschalteten PCRs das amplifizierte Produkt der ersten Reaktion nochmals vervielfältigt und somit die Sensitivität der Methode erhöht. Sie verwendet ein zweites Paar „innerer Primer“, deren DNA-Zielsequenz innerhalb des Reaktionsprodukts der „äußeren Primer“ aus der ersten PCR liegt. Da die inneren Primer nur amplifizieren können, wenn in der ersten Reaktion ein spezifisches Produkt entstanden ist, wird die Spezifität gleichsam gesteigert.

Mit Hilfe der „nested“ PCR kann beispielsweise bei Patienten mit folliculärem Lymphom das periphere Blut oder das Knochenmark auf die Translokation t(14;18) untersucht werden. Die Primerpaare sind dabei so gewählt, dass sie auf beiden Seiten der Bruchpunkte an die DNA anlagern. Ein Konsensus-Primer bindet an die J-Region des Ig-Schwerkettenlokus, während der andere Primer innerhalb des

bcl-2-Gens bindet (Abb. 5). In früheren Untersuchungen waren die „nested“ Primer in der Lage, eine t(14;18)-positive Lymphomzelle in 10^5 bis 10^6 normalen Zellen nachzuweisen^{42,43}.

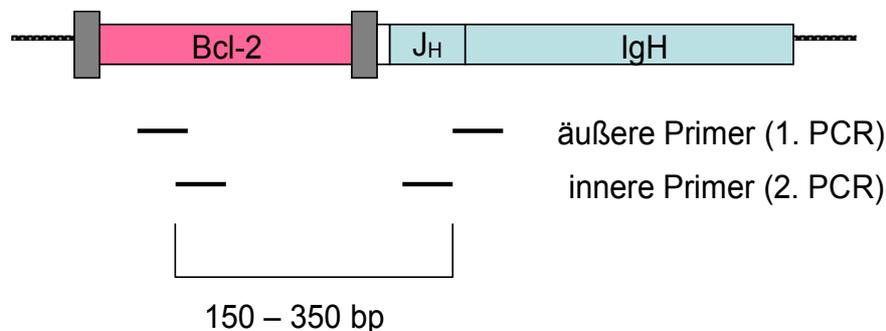


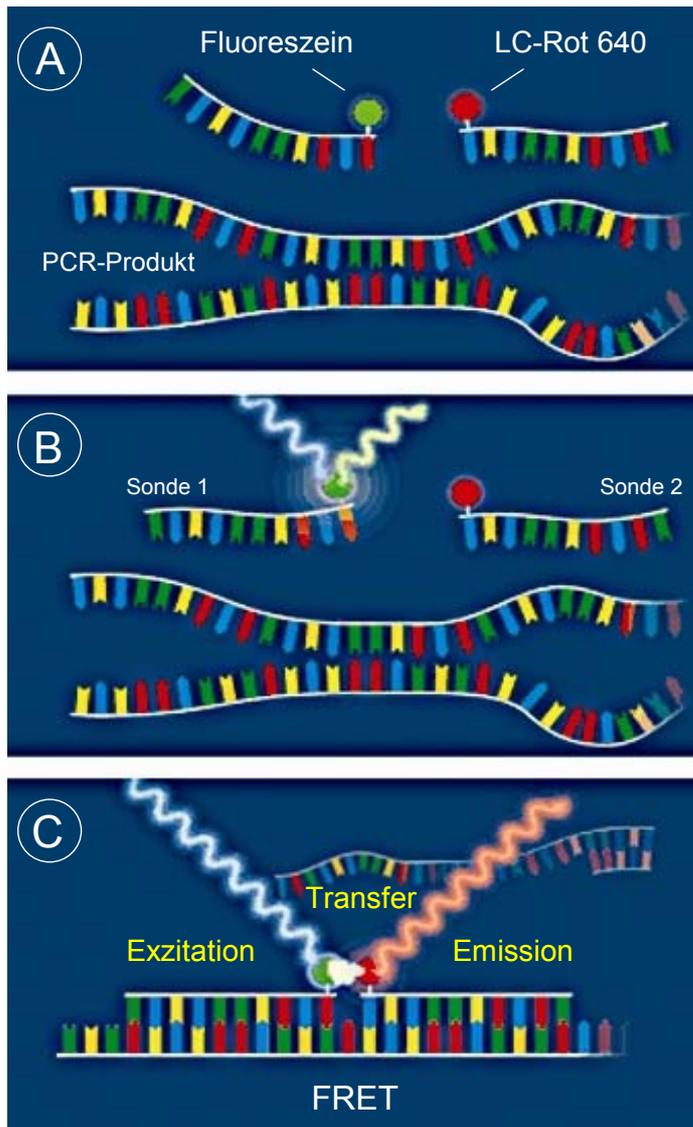
Abbildung 5: Die „nested“ PCR für die t(14;18)-Translokation. Lokalisation der äußeren und inneren Primer innerhalb der *bcl-2*/IgH-Fusion

1.2.3 Quantitative „real-time“ PCR (RQ-PCR)

Die qualitative PCR gibt nur begrenzt Aufschluss über die Menge der Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark und wurde daher in den letzten Jahren durch neue, quantitative Verfahren ergänzt, die hinsichtlich der MRD-Diagnostik die Anzahl residueller Tumorzellen messen. In der „real-time“ PCR werden amplifizierte DNA-Sequenzen bereits während der PCR mittels an Sonden angelagerter, fluoreszierender Farbstoffe sichtbar gemacht. Diese „online“-Fluoreszenzdetektion ermöglicht eine zügige Analyse der gebildeten PCR-Produkte sowie eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Kopien in einer Blut- und Knochenmarkprobe⁴⁴.

Derzeit kommen hauptsächlich zwei Systeme zum Einsatz, die TaqMan- sowie die LightCycler[®]-Technologie. Im Gegensatz zur TaqMan-Technologie, die eine mit zwei Farbstoffen beladene Hydrolysierungssonde verwendet, detektiert der LightCycler[®] (Roche Diagnostics, Mannheim) die PCR-Produkte mit einem Sondenformat, das auf zwei sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden beruht. Eine der

Oligonukleotidsonden ist am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert (Donor-Fluorophor) (Abb. 6a). Die andere Sonde ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Light-Cycler®-Rot 640 (Akzeptor-Fluorophor) markiert und am 3'-Ende zur Verhinderung einer Kettenverlängerung phosphoryliert. Die Hybridisierungssonden binden in jeder Annealing-Phase zwischen den beiden Primern an nachbarschaftliche interne Sequenzen (1-5 Nukleotide Abstand) des amplifizierten DNA-Fragmentes. Nur



nach Hybridisierung an die DNA-Matrize kommen die beiden Sonden in direkte Nachbarschaft (typischerweise 10-100 Å), die einen Fluoreszenz Energie Transfer (FRET) zwischen den beiden Farbstoffen ermöglicht.

Während des FRETs transferiert der Spenderfarbstoff Fluoreszein, der von der Light-Cycler® LED-Lichtquelle angeregt wird (Abb. 6b), einen Teil seiner Exzitationsenergie auf den roten Empfängerfarbstoff LC-Rot 640. Dieser emittiert in der Folge langwelligere rote Fluoreszenz (Abb. 6c), die „online“ in spezifischen Kanälen des LightCyclers® gemessen wird und deren Intensität insgesamt direkt proportional zu der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt

Abbildung 6: Schematische Darstellung des FRET-Prinzips mittels Hybridisierungssonden.

einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing; zu diesem Zeitpunkt sind beide Sonden an die Zielsequenz gebunden und es erfolgt ein Energietransfer. So lange keine spezifische DNA vorhanden ist, diffundieren die Hybridisierungssonden frei in der Lösung und der signalgebende FRET findet nicht statt. Mit steigender

Anzahl an PCR-Produkten nimmt auch die Menge an hybridisierten Sonden zu, so dass sich das Signal proportional zur Amplikonmenge verhält. Durch die Fluoreszenzdetektion erhöht sich die Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur konventionellen Einschritt-PCR.

Für die Quantifizierung t(14;18)-positiver Zellen im peripheren Blut und Knochenmark von Patienten mit follikulärem Lymphom wurde bisher hauptsächlich die TaqMan-Methode eingesetzt. In verschiedenen Studien⁴⁵ diente sie zur Überprüfung der Wirksamkeit von „Ex-vivo-“^{46,47} und „In-vivo-Purging“⁴⁰ vor Blutstammzelltransplantation, zur Abschätzung der Antwort auf Chemo-⁴⁸ bzw. Chemoimmuntherapie^{49,50}, sowie zur Bewertung von peripherem Blut und Knochenmark hinsichtlich des MRD-Monitoring bei Lymphompatienten⁵¹.

Für die LightCycler[®]-Technologie liegen hinsichtlich des Nachweises der Translokation t(14;18) kaum Daten vor. Daher wurde dieses System in der vorliegenden Studie zur Detektion t(14;18)-positiver Zellen verwendet, und zwar mit spezifischen, das MBR-Fragment der Translokation vermehrenden Primern. In der RQ-PCR hybridisieren die spezifischen Fluoreszenzsonden an die entstandenen MBR-J_H Fusionsprodukte und führen über die „online“-Fluoreszenzdetektion zur Quantifizierung der Translokations-DNA.

1.2.4 *Bedeutung des molekularen Monitoring für die Diagnostik und Therapie hämatologischer Neoplasien*

In keinem anderen Gebiet der Onkologie sind molekulargenetische Untersuchungen von so großer praktischer Bedeutung für die Diagnostik und Beurteilung des Therapieerfolgs wie in der Hämatologie. So gehören molekulargenetische Klonalitätsbestimmung und der Nachweis tumorspezifischer chromosomaler Aberrationen sowie der Überexpression der betroffenen Onkogene in spezialisierten Abteilungen bereits zur Standarddiagnostik.

Nicht nur beim follikulären Lymphom, sondern auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen wurde die prognostische Bedeutung einer MRD untersucht. Bisher wurde die quantitative PCR-Analyse bei verschiedenen Indikationsstellungen eingesetzt, z.B. bei der B-CLL mit zu den CDRII- und CDRIII-Regionen („complementary determining region“) komplementären allelspezifischen Oligo-

nukleotid (ASO)-Primern⁵², beim kutanen T-Zell-Lymphom über die Detektion klonaler T-Zell-Rezeptor-Gamma (TCRG) Rekombinasen⁵³ oder zur Quantifizierung der proviralen HTLV-1 Last bei der adulten T-Zell Leukämie.

Ebenso bei Philadelphia-Chromosom positiver CML, ALL und AML wurde die quantitative PCR für den *bcr-abl*-mRNA-Nachweis eingesetzt. Bei 95% der Patienten mit CML ist das Philadelphia-Chromosom, das aus der Translokation t(9,22) resultiert, der entscheidende molekulare Marker⁵⁴. Es führt zur Bildung des tumorspezifischen Fusionsgens *bcr-abl*, das zur Bestimmung residualer Leukämiezellen in mehreren Studien mittels der „real-time“ Reverse Transkriptase (RT)-PCR quantifiziert wurde⁵⁵⁻⁶⁰. Das LightCycler[®] Verfahren ergänzt hier vor allem die Zytogenetik in der Beurteilung des Krankheitsstadiums⁶¹, des therapeutischen Erfolgs allogener Stammzelltransplantation⁶² sowie der Erprobung neuer Medikamente wie Imatinib^{60,63,64}. In der Nachsorge der CML konnte insbesondere die Interventionstherapie bei molekularem Rezidiv gesteuert sowie die Wirksamkeit von Spenderlymphozyten durch die LightCycler[®]-gestützten Ergebnisse nachgewiesen werden⁶⁴.

1.2.5 *Bedeutung des Nachweises der t(14;18)-Translokation durch PCR für die Therapie und Prognose des folliculären Lymphoms*

Die Translokation t(14;18) ist als molekulargenetischer Marker des folliculären Lymphoms besonders zum Nachweis von residualen Lymphomzellen mittels PCR geeignet⁴². Die Translokations-DNA stellt ein optimales Ziel für die PCR dar, da sie in direktem Zusammenhang mit der Onkogenese steht und sich im Laufe der Erkrankung nicht verändert.

Bei Patienten mit folliculärem Non-Hodgkin-Lymphom beobachtet man nur selten eine Eradikation der MRD mit alleiniger Chemotherapie. Besonders aber nach Hochdosistherapie konnte in mehreren Studien die prognostische Bedeutung von residualen t(14;18)-positiven Lymphomzellen gezeigt werden. Voso et al unterzogen autologe Stammzelltransplantate einem immunmagnetischen „In-vitro-Purging“. PCR-Untersuchungen zeigten, dass in hochangereicherten CD34⁺-Stammzellen keine t(14;18)-positiven Zellen mehr nachweisbar waren, was auf eine Eradikation der Lymphomzellen aus dem Transplantat mit diesem Verfahren

hinweist⁶⁵. In einer Bostoner Studie wurde eine signifikante Verlängerung des rezidivfreien Überlebens für diejenigen Patienten festgestellt, die ein PCR-negatives Knochenmarkstransplantat erhielten⁶⁶. Weiterhin konnten Gribben et al. an 134 Patienten mit follikulärem Lymphom zeigen, dass der Nachweis persistierender oder wiederaufgetretener t(14;18)-positiver Zellen im Knochenmark nach Hochdosistherapie mit einem 48-fach höheren Risiko für ein Rezidiv einherging⁴². Von den Patienten ohne nachgewiesene residuale Lymphomzellen in der PCR hatte keiner ein Rezidiv, während bei allen rezidierten Patienten ein positives Ergebnis in der „nested“-PCR-Untersuchung des Knochenmarks bzw. Bluts der klinischen Manifestation vorausging. Eine klinisch komplette Remission schließt daher PCR-Positivität nicht aus. Umgekehrt ist PCR-Negativität nicht mit kompletter Remission gleichzusetzen, da bei den Lymphomen auch außerhalb des peripheren Bluts und Knochenmarks maligne Prozesse ablaufen können. Ähnlich den Ergebnissen aus Boston zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um HAAS, dass 20 Monate nach Hochdosistherapie nur diejenigen Patienten ein Rezidiv entwickelten, bei denen zuvor in der PCR t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen worden waren⁶⁷. In weiteren Studien wurde die Wirkung des Anti-CD20-Antikörpers als Monotherapie und in Kombination mit Chemotherapie auf molekulargenetischer Ebene analysiert^{68,69}. Czuczman et al. erreichten mit einer Kombination aus CHOP und Rituximab bei 95% von 40 überwiegend nicht vorbehandelten Patienten ein Ansprechen sowie bei 55% eine komplette Remission⁶⁸. Bemerkenswert war, dass bei sieben von acht Patienten mit t(14;18)-Translokation nach der Therapie PCR-Negativität erreicht wurde.

Die Daten belegen, dass der Nachweis t(14;18)-positiver Zellen für die Prognose bedeutsam und für die Nachsorgeuntersuchungen sinnvoll ist. Ungeklärt ist, inwieweit eine quantitative Analyse der residualen Lymphomzellen mit Hilfe der „real-time“ PCR weitere klinisch relevante Informationen liefert und ein Kriterium für eine interventionelle Therapie darstellt. Bisher wurde dies hauptsächlich im Rahmen von Transplantationsprogrammen erforscht, so z.B. in der quantitativen Evaluation von Autografts⁷⁰ oder der Diagnose einer MRD nach autologer bzw. allogener Stammzelltransplantation^{71,72}. Auch bei Patienten mit anderen Krebsarten⁷³ sowie gesunden Probanden⁷⁴ wurden mittels dieser Technik t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen. In der vorliegenden Studie wurde das Knochenmark sowie das periphere Blut der Patienten mit t(14;18)-positivem follikulären

Lymphom im Verlauf und nach der Therapie mit Hilfe der „nested“ PCR sowie der „real-time“ PCR untersucht.

1.3 Studienziele

Die Fortschritte der molekularzytogenetischen Diagnostik⁷⁵ werden in Zukunft Grundlage der prätherapeutischen Diagnostik und der differenzialtherapeutischen Entscheidungen sein und so die klinische und pathologische Diagnostik komplementieren. Das molekulare Monitoring während oder nach der Therapie und damit die Evaluierung genauer Responsekriterien ergänzt die bislang angewandten bildgebenden oder Laborverfahren und wird weitergehende Aussagen über die Prognose ermöglichen.

Im Vordergrund dieser Studie stand die Evaluation eines neuen, quantitativen PCR Verfahrens mittels LightCycler[®] für die t(14;18)-spezifische MRD-Diagnostik des folliculären Lymphoms. Besondere Aufmerksamkeit galt der Erfassung der Sensitivität, der Variabilität sowie der Linearität aber auch der Assoziation mit klinischen Parametern wie Krankheitsstadium, Tumorlast oder Unterschied zwischen Knochenmark und peripherem Blut. Darüber hinaus sollten auf molekularer Ebene die Wirksamkeit verschiedener Therapiemodalitäten bei neu-diagnostizierten sowie rezidierten Patienten mit folliculärem Non-Hodgkin-Lymphom bewertet werden.

Das langfristige Ziel ist die Optimierung der Behandlung dieser Patienten, um höhere Ansprechraten, längere Krankheitsfreiheit, bessere Lebensqualität und eines Tages vielleicht die Heilung der Erkrankung zu erreichen.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

2.1.1 *Einschlusskriterien*

In die Untersuchung wurden insgesamt 52, in der Zeit von Juli 1999 bis Dezember 2002 behandelte Patienten, eingeschlossen. Die Patientencharakteristika können Tabelle 1 entnommen werden. Patienten wurden aufgenommen, sofern sie hinsichtlich der REAL-Klassifikation unter einem CD20-positiven follikulären Lymphom litten sowie die t(14;18)-Translokation im peripherem Blut oder im Knochenmark mittels „nested“ PCR nachweisbar war. Die Staging-Einteilung richtete sich nach den Kriterien der Ann-Arbor-Klassifikation¹⁷ und die histologische Diagnose wurde von einem Referenzpathologen bestätigt. Die Patienten gaben nach Aufklärung ihr Einverständnis und die Studie wurde gemäß der Richtlinien der Ethikkommission der Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.1.2 *Therapie*

Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob bei ihnen erstmalig ein follikuläres Lymphom diagnostiziert wurde oder sie bereits mit konventioneller Chemotherapie vorbehandelt worden waren und nun ein Rezidiv erlitten. Die Gruppe der Erstdiagnose-Patienten wurde im Rahmen einer Multicenter-Studie behandelt und zwei unterschiedlichen Therapieregimen zugeführt. Der eine Arm bestand aus sechs Zyklen R/FM (Rituximab plus Fludarabin/Mitoxantron), während der zweite Arm die Behandlung mit drei Zyklen R/CHOP (R plus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison), zwei Zyklen R/HAM (R plus Hochdosis Cytosin-Arabinosid und Mitoxantron) und einem Zyklus Hochdosis-R/BEAM (R plus Carmustin/Etoposid/Cytarabin/Melphalan) mit nachfolgender peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) vorsah (Abb. 7).

Tabelle 1: Patientencharakteristika

Parameter	Patienten mit	
	Erstdiagnose	Rezidiv
Anzahl	40	12
Alter		
Median	54	50
Bereich	29 – 80	38 - 66
Geschlecht (M / W)	18 / 22	7 / 5
Stadium		
II	4	
III	8	
IV	28	
Knochenmarkinfiltration (Histologie)	23*	5**
Splenomegalie	17	
„Bulky disease“	15	
Rezidivstatus		
1. Rezidiv		8
2. Rezidiv		3
3. Rezidiv		1
Zeitraum zwischen Diagnose und 1. Rezidiv (Monate)		
Median		31
Bereich		11 – 100
Vorbehandlung mit zytotoxischer Chemotherapie (Zyklen)		
Median		7
Bereich		6 – 24
Vorbehandlung mit Radiatio		4

* 32 bzw. ** 9 Patienten wurden histologisch auf Knochenmarkbeteiligung untersucht

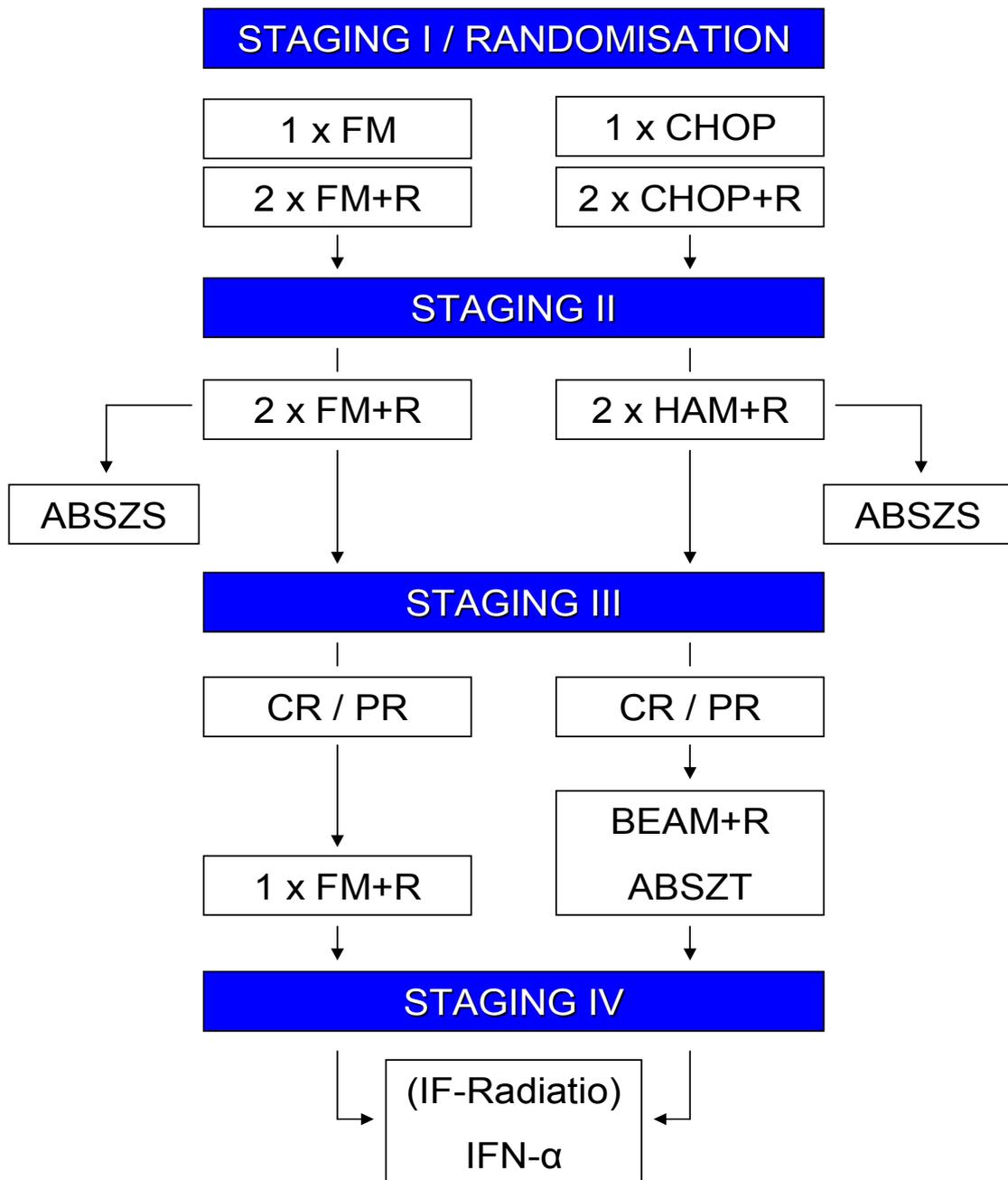


Abbildung 7: Therapieplan für Patienten mit Erstdiagnose eines follikulären Lymphoms. ABSZS = autologe Blutstammzellseparation; ABSZT = autologe Blutstammzelltransplantation; IF = „involved field“

Sofern es nach den verschiedenen Therapieschemata zu einer kompletten oder partiellen Remission kam, war eine Erhaltungstherapie mit Interferon- α vorgesehen, die frühestens vier Wochen nach der Transplantation eingeleitet wurde.

Die Rezidiv-Patienten dagegen erhielten zuerst R/HAM, gefolgt von Hochdosis-R/BEAM und PBSZT. Der Antikörper Rituximab (375 mg/m^2) wurde jeweils einen Tag vor Beginn der Chemotherapie verabreicht.

Die FM-Chemotherapie beinhaltete sechs Zyklen Fludarabin (25 mg/m^2 , Tage 1 bis 3) und Mitoxantron (10 mg/m^2 , Tag 1), die in vierwöchigem Abstand gegeben wurden. Die ebenfalls alle vier Wochen durchgeführte CHOP-Chemotherapie bestand aus drei Zyklen Cyclophosphamid (750 mg/m^2 , Tag 1), Adriamycin (50 mg/m^2 , Tag 1), Vincristin (2 mg/m^2 , Tag 1) und Prednison (100 mg/m^2 , Tag 1 bis 5). Das dosiserhöhte HAM-Regime bestand aus Hochdosis-Cytarabin (2 g/m^2 in 12 h, Tag 1 bis 2) und Mitoxantron ($10 \text{ mg/m}^2/\text{Tag}$, Tag 2 bis 3). Bei den neu-diagnostizierten Patienten diente diese Kombination als Konsolidierungstherapie, während sie bei den rezidivierten Patienten zur Induktion einer Remission eingesetzt wurde. In beiden Gruppen diente R/HAM in Kombination mit G-CSF ($300 \mu\text{g}/\text{Tag}$) (Neupogen, Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) der Stammzellmobilisierung.

Das Prätransplantations-Konditionierungs-Regime BEAM bestand aus Carmustin (300 mg/m^2 , Tag -7), Etoposid (300 mg/m^2 , Tage -7 bis -4), Cytarabin (400 mg/m^2 , Tage -7 bis -4) und Melphalan (140 mg/m^2 , Tag -3). 24 Stunden nach Beendigung der Hochdosistherapie wurden autologe periphere Blutstammzellen (PBSZ) ohne Zusatz eines hämatopoetischen Wachstumsfaktors reinfundiert. Ein Patient erhielt nach nicht-myeloablativer Konditionierungstherapie mit Fludarabin (150 mg) und totaler Körperbestrahlung (TBI, 2 Gy , „single shot“) eine allogene PBSZ-Transplantation von seinem HLA-identischen Bruder.

2.1.3 *Remissionskriterien*

Eine klinisch komplette Remission (CR) erforderte eine vollständige Rückbildung aller objektiven Krankheitsbefunde zum Zeitpunkt des Restaging mit völliger Rückbildung vorbestehender Lymphknotenschwellungen sowie einer vorbestehenden Hepatomegalie oder Splenomegalie. Zusätzlich musste eine weiterbestehende Lymphominfiltration des Knochenmarks durch eine Knochenmarkbiopsie ausgeschlossen und die Normalisierung des Blutbildes (Granulozyten > 1.500/ μ l, Hb > 12 g/dl, Thrombozyten > 100.000/ μ l) gesichert werden. Die Patienten befanden sich in klinisch partieller Remission (PR), sofern sich das Blutbild normalisierte und eine mehr als 50%-ige Rückbildung aller messbaren und evaluierbaren Lymphommanifestationen ohne Auftreten neuer Manifestationen vorlag.

Die Remissionskriterien mussten für mindestens vier Wochen nach Abschluss der Therapie erfüllt sein. Traten nach einer CR von mindestens einem Monat B-Symptome, neue oder initiale Tumorerläsionen wieder auf, wurde dies als Rezidiv definiert.

2.2 Zellen

2.2.1 Arbeitsschritte

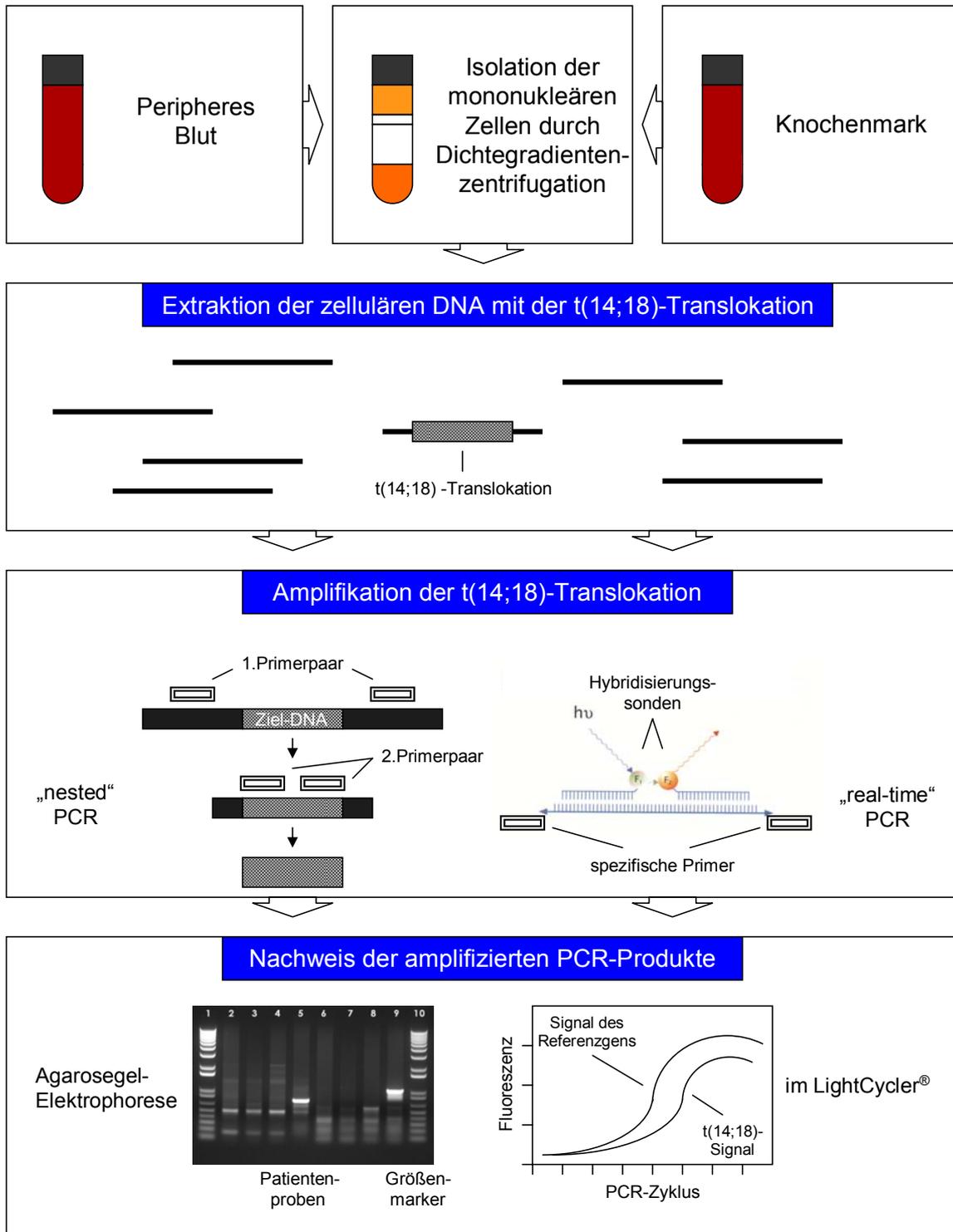


Abbildung 8: Experimentelles Vorgehen von der Probenentnahme bis zur PCR-Analyse.

2.2.2 Probenentnahme

Primäre humane mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus dem peripheren Blut (PB) oder dem Knochenmark (KM) gewonnen. Den Patienten wurde über eine Schmetterlingskanüle 20 ml peripheres Blut abgenommen und in EDTA enthaltende Blutröhrchen gefüllt. Knochenmark wurde in der Regel aus dem hinteren Beckenkamm entnommen. Die übliche Menge betrug 10 ml Knochenmark, das mit Heparin antikoaguliert wurde. Insgesamt wurden den Studienpatienten 159 Blut- und Knochenmarkproben entnommen.

2.2.3 Dichtegradientenzentrifugation

Die mononukleären Zellen (MNC) (Lymphozyten und Monozyten) aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Diese Methode macht sich die unterschiedliche Dichte von Granulozyten, Erythrozyten und MNC zu eigen, um sie im Vollblut bzw. Knochenmark voneinander zu separieren. Um Erythrozyten und Zelldetritus zu entfernen, wurden zwei Dichtegradientenzentrifugationen hintereinander durchgeführt.

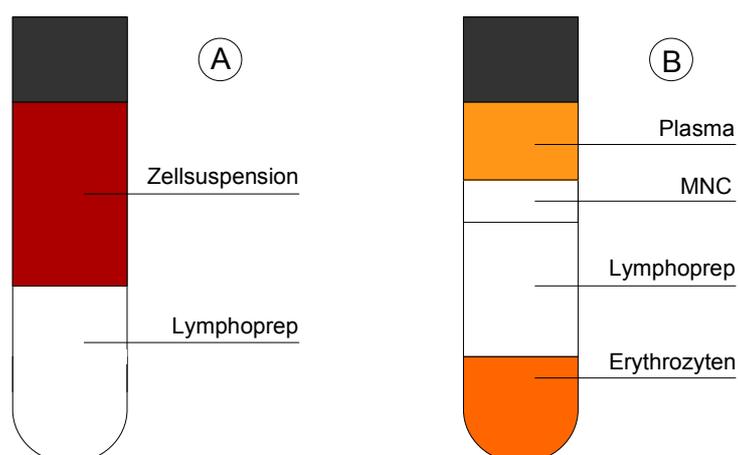


Abbildung 9: Dichtegradientenzentrifugation. (A) Überschichtung der Lymphoprep-Flüssigkeit mit der Zellsuspension. (B) Die Zentrifugation trennt die verschiedenen Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte in unterschiedliche Phasen auf.

Die Knochenmarkproben mussten hierzu jeweils mit 10 ml PBS (Biochrom, Berlin) 1:1 auf 20 ml verdünnt werden. In einem 50 ml-Falcon-Röhrchen (Greiner GmbH, Solingen) wurden 8 ml Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet (Abb 9a). Nach 30 min. Zentrifugation mit 500 g, während der die Erythrozyten und Granulozyten der Schwerkraft entsprechend durch die Lymphoprep-Phase nach unten wanderten und pelletierten, waren vier Phasen entstanden (Abb 9b). Mit einer Pipette wurde der MNC-Interphasering unter dem Plasma abgezogen, in 10 ml PBS resuspendiert und die Dichtegradientenzentrifugation wiederholt.

Es bildeten sich zwei Phasen, oben der Puffer und unten das gelblich-weiße Zellpellet. War das Pellet noch rot gefärbt, befanden sich noch Erythrozyten darin, die mit einem Lysepuffer (1000 ml Puffer enthielten 8,29 g NH_4Cl , 1,00 g KHCO_3 , 0,0372 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ plus Aqua ad inject. ad 1000 ml) zerstört wurden. Nach Vortexen wurde das Gemisch 7 min. stehengelassen und anschließend mit 500 g abermals zentrifugiert. Der Überstand enthielt die im Lysereagenz aufgelösten Resterythrozyten und wurde abgeschüttet.

Nach einem anschließenden Waschvorgang in ca. 9 ml PBS, 10-minütiger Zentrifugation mit 500 g und Abschütten des Überstands wurde das MNC-Pellett mit PBS auf 1 ml verdünnt. Abhängig von der mittels Zellzähler (Coulter Micro Diff II, Coulter Electronics, Krefeld) gemessenen Konzentration der MNC in der Suspension stellten wir ein Aliquot mit 5×10^6 Zellen her, das kurz zentrifugiert wurde (1 min., 500 g) und nach Abpipettieren des Überstands bei -20°C eingefroren werden konnte.

2.2.4 DNA-Extraktion

In dieser Studie verwendeten wir MNC-Proben, da die Translokation nur in Lymphozyten zu finden ist und die Dichtegradientenzentrifugation Erythrozyten entfernt, deren Porphyrinverbindungen die PCR beeinträchtigen können. Die Isolierung der DNA aus den MNC erfolgte in der Regel automatisch mit Hilfe eines Pipettierrobotors (Magna Pure LC, Roche Diagnostics) und des „Magna Pure LC DNA Isolation Kits I“ (Roche Diagnostics). Gemäss der Herstellerangaben wurden 5×10^6 MNC in 200 μl PBS suspendiert und in die Probenpatrone gegeben. In

einem automatischen Programm des Geräts wurde jede Probe mit 300 µl Lyse- bzw. Bindungspuffer gemischt, in 100 µl Proteinase K inkubiert und in 150 µl einer Suspension aus magnetischen Glaspartikeln übertragen. Nach drei Waschvorgängen wurde die DNA in 100 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C eingefroren.

Zum Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden extrahierten wir DNA auch manuell mit dem „QIAamp[®] DNA Mini Blood Kit“ (Qiagen, Hilden). Die DNA-Extraktionsprozedur umfasste drei Schritte: 1. Adsorption an die Säulenmembran, 2. Beseitigung von übriggebliebenen Verunreinigungen mit verschiedenen Waschpuffern und 3. die Elution der reinen Nukleinsäuren. Das Zentrifugieren der Säulen fand jeweils bei Raumtemperatur mit 13.000 bzw. 5.000 g statt; höhere Geschwindigkeiten konnten den DNA-Ertrag nicht steigern.

Zu Anfang wurden die aufgetauten Proben in den 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen (Eppendorf, Köln) kurz abzentrifugiert (10 sec., 5.000 g), der Überstand verworfen, ca. 200 µl PBS zugegeben und mit dem Pellet vermischt. Nun wurden die Zellen in 33 µl der Protease und 200 µl des AL Lysepuffers aufgenommen und durch 15-sekündiges „Vortexen“ lysiert. Die Salz- und pH-Werte des Lysats stellten sicher, dass die Proteinstrukturen ohne Beeinträchtigung der DNA zerstört wurden. Danach wurden die Proben im Inkubator (Thermostat 5320, Eppendorf) auf 56°C erwärmt, bis die Zellen nach 10 min. eine maximale Lyse erreichten. Eine längere Inkubation hatte keinen Effekt auf Menge oder Qualität der aufgereinigten DNA, sie bewirkte im Gegenteil sogar eine DNA Degradierung. Nach kurzem Abzentrifugieren (10 sec., 5.000 g) und Zugabe von 200 µl Ethanol (96 - 100%) zur Fällung der DNA wurde wiederum 15 Sekunden „gevortext“ und kurz zentrifugiert (10 sec., 5.000 g). Schließlich gaben wir 750 µl dieses Ansatzes auf die in einem 2 ml Sammelröhrchen befindliche QIAamp[®]-Zentrifugationssäule, auf der die DNA festhaftete, und zentrifugierten sie 1 Minute bei 13.000 g. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule in ein neues Sammelröhrchen eingebracht und mit 500 µl des ersten Waschpuffers AW1 (enthielt 57% Ethanol) übergossen. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g und Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule erneut in ein Sammelröhrchen gestellt, 500 µl AW2 Puffer (enthielt 70% Ethanol) zugegeben und 3 min. lang bei 13.000 g zentrifugiert. Die Kombination

beider Waschpuffer, die im Vorfeld mit 96 - 100%igem Ethanol auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt worden waren, gewährleistete eine hohe Reinheit der eluierten DNA, während die Waschbedingungen eine komplette Entfernung der übrigen Verunreinigungen ohne Beeinträchtigung der DNA-Membran-Bindung bewirkten. Um auch den restlichen Puffer zu entfernen, wurde in einem neuen Sammelröhrchen nochmals 1 min. bei 13.000 g zentrifugiert. Anschließend inkubierten wir die trockene Säule für 5 min. mit 70 µl des AE Elutionspuffers in einem Eppendorf Gefäß. Nach 1-minütiger Zentrifugation mit 5.000 g wiederholten wir den Schritt mit 50 µl des AE Puffers in einem weiteren Eppendorf-Gefäß. Schließlich erhielten wir zwei Eluate aufgereinigter Nukleinsäuren, die bei -20°C gelagert werden konnten.

2.2.5 *Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung*

Bei der Spektralphotometrie wird die Lichtschwächung (Extinktion) gemessen, die bei konstanter Wellenlänge des Lichts von den Eigenschaften der Substanz im Strahlengang abhängt. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde im Spektralphotometer (Lambda EZ210, PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) bei einer Absorption von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) analysiert.

Das Spektralphotometer besitzt zwei Messkanäle; zur Kalibrierung wurden beide mit Küvetten besetzt, die autoklaviertes Wasser enthielten. Für die Konzentrationsmessung verdünnten wir die DNA 1:200 mit autoklaviertem Wasser (4 µl DNA auf 796 µl Wasser) und befüllten damit eine der Küvetten, die vor jeder Messung mit Ethanol gereinigt und mit autoklaviertem Wasser nachgespült wurde. Die Optische Dichte (OD) einer Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm ist definiert als der Extinktionswert, der sich durch Absorptionsmessung der Probe in einer 1 cm Küvette ergibt. Bei doppelsträngiger DNA ergibt sich aus empirischen Werten für eine OD von 1 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. 0,05 ng/µl⁷⁶.

Die Konzentration c ergab sich dann wie folgt aus der Messung:

$$c [\text{DNA}] = \text{OD}_{260\text{nm}} (\text{gemessen}) \times 0,05 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnung}$$

Bsp. für $\text{OD}_{260\text{nm}} = 0,0250$:

$$c [\text{DNA}] = 0,0250 \times 0,05 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 200 = \underline{250 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

Als Grundlage diente das Lambert-Beer'sche Gesetz.

Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die Tatsache, dass die Extinktion E einer Probe linear von der Konzentration c der gelösten Substanz und von der Schichtdicke d der Küvette abhängt. Der molekulare Extinktionskoeffizient ϵ stellt die Extinktion dar, die eine Lösung von 1 mol/l bei 1 cm Schichtdicke hätte und ist für jede Substanz und Wellenlänge charakteristisch. Bei konstanter Schichtdicke d ist die Extinktion E daher proportional zur Konzentration c der Lösung. Da die Schichtdicke d der Küvetten standardmäßig 1 cm ist, ist die Extinktion E gleich der optischen Dichte.

Um festzustellen, ob Verunreinigungen vorlagen, wurde die OD zusätzlich bei 280 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen, und der Quotient aus $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ bestimmt. Dieser sollte bei reiner DNA etwa 1,8 betragen. War der Wert kleiner, so lag möglicherweise eine Verunreinigung durch Proteine vor. Höhere Werte wiesen auf eine DNA-Denaturierung hin.

2.3 „Nested“ PCR

2.3.1 Qualitative *t(14;18)*-spezifische PCR

Primer-Sequenzen:

1. Schritt:

MBR1: 5' - CAG CCT TGA AAC ATT GAT GG - 3'

MBR2: 5' - ACC TGA GGA GAC GGT GAC C - 3'

2. Schritt:

MBR3: 5' - TAT GGT GGT TTG ACC TTT AG 3'

MBR4: 5' - ACC AGG GTG CCT TGG CCC CA - 3'

Mit der von Gribben et al⁴² beschriebenen „nested“ Primer-PCR wurde genomische DNA spezifisch für die MBR des *bcl-2/IgH*-Fusionsgens amplifiziert. Die PCR wurde mit Hilfe des „HotStar Taq DNA Polymerase Kit“ (Qiagen) durchgeführt, der bis auf die Primer (Interactiva, Ulm) alle benötigten Reagenzien lieferte. Gemäß dem erwähnten Zwei-Schritt-Verfahren (vgl. Einleitung) wurde die DNA in zwei nacheinander ablaufenden PCRs à 35 Zyklen vervielfältigt. Zuerst wurde 1 µg der DNA jeder Probe mit H₂O auf 30 µl aufgefüllt und im entsprechend den Herstellerangaben angefertigten Ansatz mit einem „Mastercycler personal“ PCR-System (Eppendorf) amplifiziert. Jeder PCR-Zyklus bestand aus einer 1-minütigen Denaturierung bei 95°C, einer 1-minütigen „Annealing“-Phase bei 57°C sowie einer 1-minütigen „Extension“ bei 72°C. Der letzte Kettenverlängerungsschritt war auf 10 min. verlängert, um eine komplette Synthese der amplifizierten DNA sicherzustellen. Jeweils 5 µl dieser PCR-Produkte wurden im zweiten Schritt unter gleichen Bedingungen mit dem zweiten Primerpaar reamplifiziert mit der Modifikation, dass als „Annealing“-Temperatur 54°C gewählt wurde.

In einem „Spiking“-Experiment bestimmten wir die Sensitivität sowohl der „nested“ PCR als auch der RQ-PCR mit der *t(14;18)*-positiven Zell-Linie K422 (DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig).

Hierzu wurden 5×10^5 bis 5 K422-Zellen in Zehner-Verdünnungsstufen mit jeweils 10^6 t(14;18)-negativen MNC vermischt und die DNA nach der Extraktion mit beiden PCR-Verfahren untersucht.

2.3.2 *Agarosegel-Elektrophorese*

Die spezifischen Syntheseprodukte wurden mittels einer 2%igen Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen. Hierzu wurden 5 g Agarose (Roth, Karlsruhe) zu einem Endvolumen von 250 ml in 1x TBE Puffer (5x TBE Ansatz: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA auf 2 Liter destilliertes Wasser) durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst, 150 μ l Ethidiumbromid (500 μ g/ml) zugegeben und bis zum Verfestigen des Gels stehen gelassen. 15 μ l PCR-Produkt wurden mit 3 μ l 6x Auftragspuffer (Blue/Orange Loading Dye 6x) versetzt und 18 μ l davon aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 135 V etwa 1,5 Stunden lang durchgeführt.

Das Amplifikat wurde entsprechend seiner Länge elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und konnte aufgrund der Ethidiumbromid-Färbung fluoreszenzoptisch im UV-Licht nachgewiesen werden. Die Ablichtung der Agarosegel-Banden erfolgte auf einem UV-Tisch mit der Quantity One Software 4.0.3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A.). Anhand eines Größenmarkers (100 bp-Marker) wurde die Größe der entstandenen Banden bestimmt. So konnten in Abhängigkeit vom Patienten spezifische Banden zwischen 150 und 350 Basenpaaren nachgewiesen werden.

2.4 Quantitative „real-time“ PCR

2.4.1 Aufbau des LightCyclers®

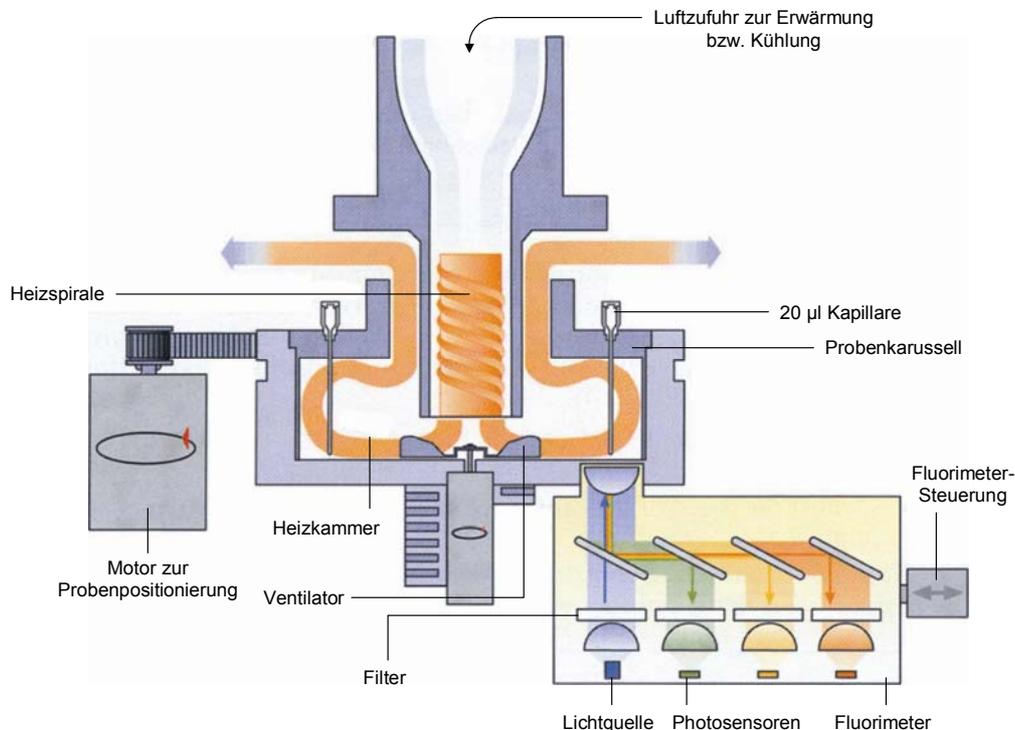


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der LightCyclers®.

modifiziert nach Roche Diagnostics (Bedienungsanleitung)

Als grundsätzliches Merkmal des LightCyclers® ermöglicht die Kombination aus Thermocycler und Fluorimeter, Daten schon während der laufenden PCR in „real-time“ anzuzeigen und zu analysieren. Das Probenkarussell (Roche Diagnostics) als zentrales Element fasst 32 Proben in Glaskapillaren (Roche Diagnostics), die als Küvetten für die fluorimetrische Bestimmung der gebildeten PCR-Produkte dienen. In der thermischen Kammer sorgt ein Ventilator für die gleichmäßig schnelle Ausbreitung der von der Heizspirale in die Kammer geblasenen Luft. Die Energiequelle der optischen Fluoreszenzkomponente besteht aus einer blauen Diode, deren Licht mittels einer Spezialoptik auf 1 mW bei 470 nm Wellenlänge gefiltert wird, das in der Folge auf die einzelnen Proben in den Glaskapillaren fokussiert wird. Bei Vorliegen spezifischer PCR-Produkte bewirkt das einfallende Licht einen FRET zwischen den verwendeten Hybridisierungs sonden, wobei Lichtemissionen bestimmter Wellenlängen (530 nm, 640 nm (hier verwendet) oder 710 nm) in drei verschiedenen Detektionskanälen analysiert werden können.

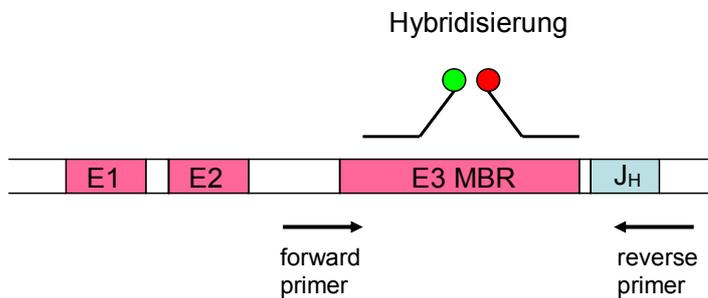
2.4.2 Quantitative $t(14;18)$ -spezifische PCR

Abbildung 11: Lokalisation der Amplifizierungsprimere und der Hybridisierungsstellen.

E1 – E3 = Exon 1 – 3 von Chromosom 18

JH = IgH-Segment von Chromosom 14

Für die quantitative $t(14;18)$ -spezifische PCR wurde der „LightCycler® $t(14;18)$ Quantification Kit (MBR)“ (Roche Diagnostics) verwendet. Dieser ist darauf ausgelegt, Patienten-DNA mit der für die Translokation $t(14;18)$ -spezifischen MBR nachzuweisen. Als Referenzgen wurde das Gen für tPA („tissue plasminogen activator“) im gleichen

PCR-Lauf aber in einer separaten Kapillare amplifiziert. Das tPA-Reaktionsprodukt diente als Kontrolle für die PCR-Reaktion und als Referenzgen für die relative Quantifizierung.

32 Glaskapillaren wurden zu Beginn in die Metalladapter (Roche Diagnostics) des auf 4°C vorgekühlten Kühlblocks platziert. Alle Reagenzien des $t(14;18)$ -Kits wurden von -25°C auf Eis aufgetaut und anschließend in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge kurz bei 100 g abzentrifugiert. Zur Zubereitung der Reaktionspuffer verwendeten wir zwei lichtundurchlässige 2 ml Eppendorfgefäße (Eppendorf), je eins für den MBR- und den tPA-Puffer. Die Mischung der „FastStart“-Enzymlösung mit 70 μl der Reaktionsmischung ergab das „Hot Start“ Reaktionsgemisch, fortan als Enzym „Master Mix“ bezeichnet.

85 μl des autoklavierten Wassers, 40,8 μl Magnesiumchlorid (25 mmol/l) sowie 34 μl des „Master Mixes“ wurden jeweils unter Mischen in die beiden Eppendorfgefäße gegeben. Nach Zugabe von je 95,2 μl der beiden Detektionslösungen (für $t(14;18)$ und das Referenzgen tPA) in die entsprechenden MBR- und tPA-Puffer wurden die Eppendorf Gefäße ebenfalls in den Kühlblock gestellt, um sie vor Licht und Erwärmung zu schützen. Jeweils 15 μl der beiden Reaktionspuffer und 5 μl der entsprechenden Probe konnten nun gemäß dem Protokoll in die entsprechenden Kapillaren pipettiert werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

		für 1 Kapillare	für 16 Kapillaren
Puffer	H ₂ O	5,0 µl	85,0 µl
	MgCl ₂ (25 mmol/l)	2,4 µl	40,8 µl
	Master Mix	2,0 µl	34,0 µl
	Detektionslösung (MBR o. tPA)	5,6 µl	95,2 µl
	Gesamt: Ansatz	15,0 µl	255,0 µl
Probe	Extrahierte DANN	5,0 µl	
	<u>Reaktionsansatz</u>	<u>20,0 µl</u>	

Die ersten vier Proben (Positionen 1 bis 4) enthielten die MBR-Kalibrator DNA, die aus der t(14;18)-positiven DOHH2 Zell-Linie stammte. Der Kalibrator diente als Positivkontrolle sowie für die nachfolgende Quantifizierung. Für die Negativkontrollen auf den Positionen 29 bis 32 verwendeten wir je 5 µl steriles Wasser, während die restlichen Kapillaren (Positionen 5 bis 28) die DNA der sechs Patientenproben aufnahmen. Damit sich nun Puffer und Probe vermischten, wurden alle 32 Glaskapillaren in den Metalladaptoren zentrifugiert (100 g, ca. 9 sec.) und schließlich in das Lightcycler-Karussell (Roche Diagnostics) eingesetzt.

Die PCR wurde mit der „Hot Start“ Methode begonnen, in der die „FastStart“ Taq DNA Polymerase während einer 8-minütigen Inkubation bei 95°C aktiviert wurde. Es folgten 45 Amplifikationszyklen mit jeweils 10 sec. Denaturierung bei 95°C, 10 sec. „Annealing“ bei 54°C und 20 sec. Kettenverlängerung bei 72°C. Am Ende des Laufs wurden die Proben auf 40°C abgekühlt. Abbildung 12 zeigt exemplarisch einen der LightCycler®-Läufe mit mehreren t(14;18)-positiven Proben.

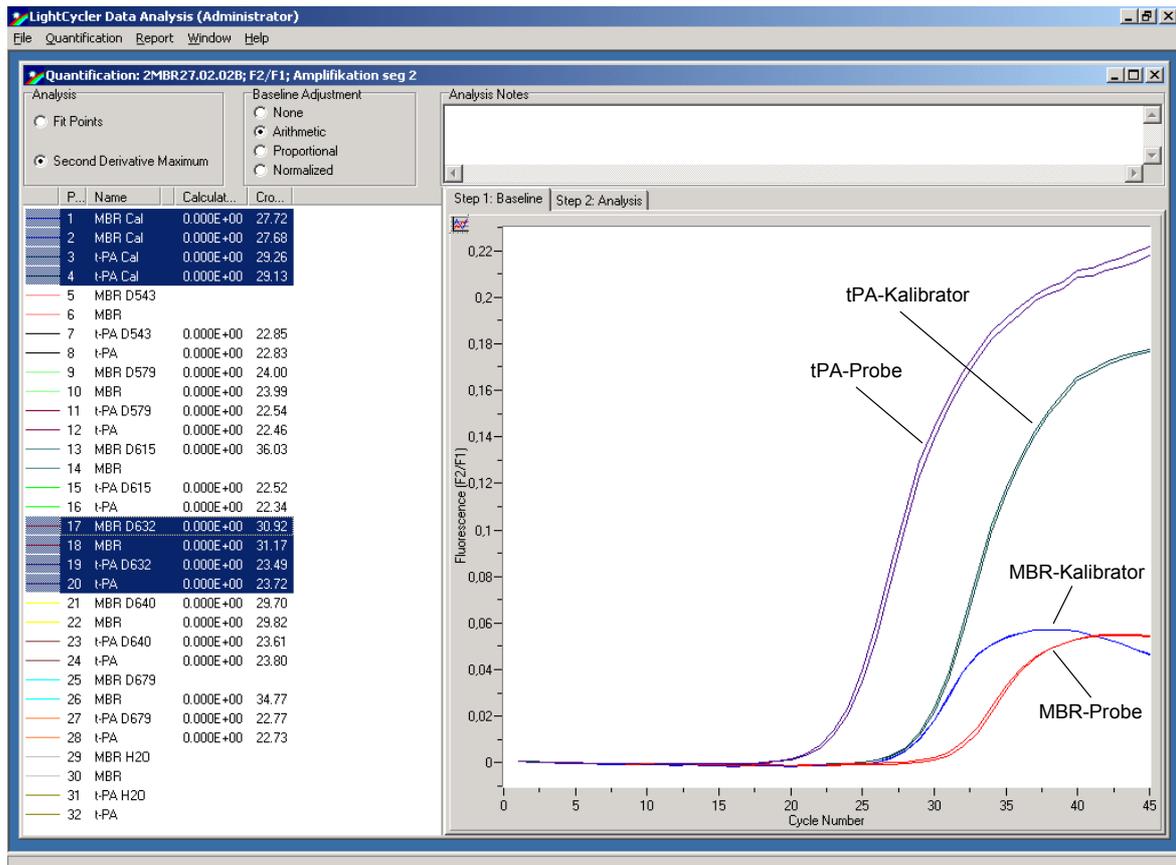


Abbildung 12: „Real-time“ PCR-Analyse der Translokation t(14;18) im LightCycler®. Dargestellt sind die MBR- und tPA-Fluoreszenzkurven der Kalibratoren sowie einer positiven Probe aus einem repräsentativen Experiment im Doppelansatz.

2.4.3 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung diente dazu, Effizienzwankungen der PCR sowie Unterschiede in der Qualität und Quantität der einzelnen DNA-Proben zu kompensieren. Mit Hilfe eines Translokation-positiven Kalibrators, der bei jedem PCR-Lauf amplifiziert wurde, konnten unabhängig von der Effizienz der jeweiligen RQ-PCR t(14;18)-Werte aus separaten Läufen miteinander verglichen werden. Zur Normalisierung probenspezifischer Unterschiede bezüglich Menge und Güte der DNA wurde das in jeder Zelle vorkommende tPA-Gen parallel zum MBR-Ansatz jeder Probe amplifiziert.

Bei jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz im LightCycler[®] gemessen. Dieses Signal war direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und stieg wie auch die Menge an DNA exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Als Maß für die Menge der t(14;18)- bzw. tPA-Kopien diente der „Crossing Point“ (CP). Der für jede Probe spezifische CP war der Zyklus, in dem die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve ihr Maximum beschrieb. Die Relative Quantification Software (Roche Diagnostics) verglich die ermittelten „Crossing Points“ der Proben mit denen der Standards und berechnete daraus den relativen MBR/tPA-Quotienten: Die probenspezifische Menge an t(14;18)-Kopien wurde über das Verhältnis der t(14;18)-Kopien zu den tPA-Kopien angegeben. Dieser Quotient wiederum wurde zu dem t(14;18)/tPA-Quotienten des Kalibrators in Verhältnis gesetzt. Setzte man den Quotienten des DNA-Kalibrators auf den Wert 1 fest, bedeutete ein Proben-spezifischer Quotient von z.B. 10 demnach, dass in der Probe bezogen auf tPA eine zehnmal höhere t(14;18)-DNA Menge vorlag als in der Kalibrator-DNA. Diese relative Quantifizierung ermöglichte eine gleichbleibende Kalibrierung zwischen verschiedenen PCR-Läufen.

2.5. Statistische Auswertung

Alle klinischen und im Labor bezogenen Daten wurden unter Verwendung kommerziell erhältlicher Computerprogramme (EXCEL XP und SPSS Version 10.0) mit geläufigen statistischen Methoden ausgewertet. Aus den erhaltenen Daten wurden Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen berechnet. Signifikante Unterschiede bezüglich der t(14;18)/tPA-Quotienten verschiedener Patientengruppen wurden mit dem *U*-Test nach Mann und Whitney ausgearbeitet. Als signifikant wurde ein p-Wert von $p < 0,05$ betrachtet. Der Variationskoeffizient wurde durch das Verhältnis von Standardabweichung zu Mittelwert berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 **Eigenschaften der t(14;18)-spezifischen quantitativen „real-time“ PCR mit dem LightCycler®**

3.1.1. *Sensitivität der RQ-PCR*

Zunächst stellte sich die Frage, welche Sensitivität die RQ-PCR aufweist und ob diese vergleichbar mit der „nested“ PCR ist. Unklar war ebenso der Einfluss der Extraktionsmethode (manuell versus automatisiert mit MagnNA Pure) auf die Sensitivität der PCR.

Aus diesem Grund führten wir „Spiking“-Experimente mit K422-Zellen durch, in denen die t(14;18)-positiven Zellen in Zehner-Verdünnungsstufen von 5×10^5 bis 5 mit jeweils 10^6 t(14;18)-negativen MNC vermischt wurden. Die DNA wurde jeweils manuell mit dem Qiagen-Kit sowie automatisch mit dem MagnNA Pure LC-Pipettierroboter (Roche Diagnostics) extrahiert. Anschließend untersuchten wir die DNA sowohl mit der „nested“ PCR als auch mit der RQ-PCR im LightCycler® auf t(14;18)-Positivität und verglichen die Sensitivität.

Nach Extraktion mit MagnNA Pure konnten in der herkömmlichen „nested“ PCR 5 t(14;18)-positive Zellen in 5×10^6 normalen MNC nachgewiesen werden (Abb. 13). Dies entspricht einer Sensitivität von 10^{-6} .

Der LightCycler® hingegen detektierte 50 t(14;18)-positive Lymphomzellen in 5×10^6 normalen Zellen, was einer Sensitivität von 10^{-5} entspricht (Abb. 14). Dies bedeutet, dass die „nested“ PCR um eine ganze Zehnerpotenz sensitiver ist als die „real-time“ PCR.

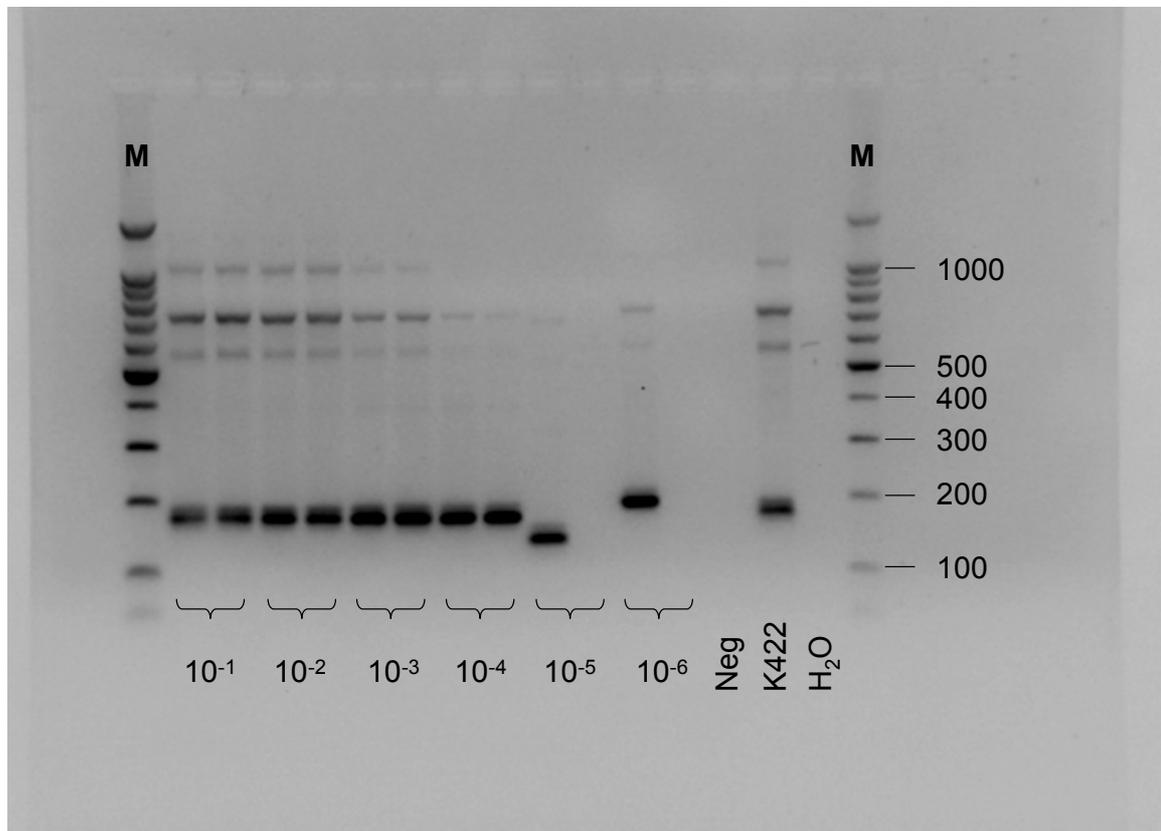


Abbildung 13: Agarosegel-Elektrophorese nach „nested PCR“ der K422-Verdünnungen. 10-fache Verdünnungen von 5×10^5 bis 5 der t(14;18)-positiven K422 Zellen in 5×10^6 normalen MNC wurden nach MagNA Pure Extraktion in der „nested“ PCR in Doppelbestimmung amplifiziert. Die t(14;18)-positiven PCR-Produkte bilden auf dem Gel spezifische Banden zwischen 100 und 200 bp.

M: 100-Basenpaarmarker

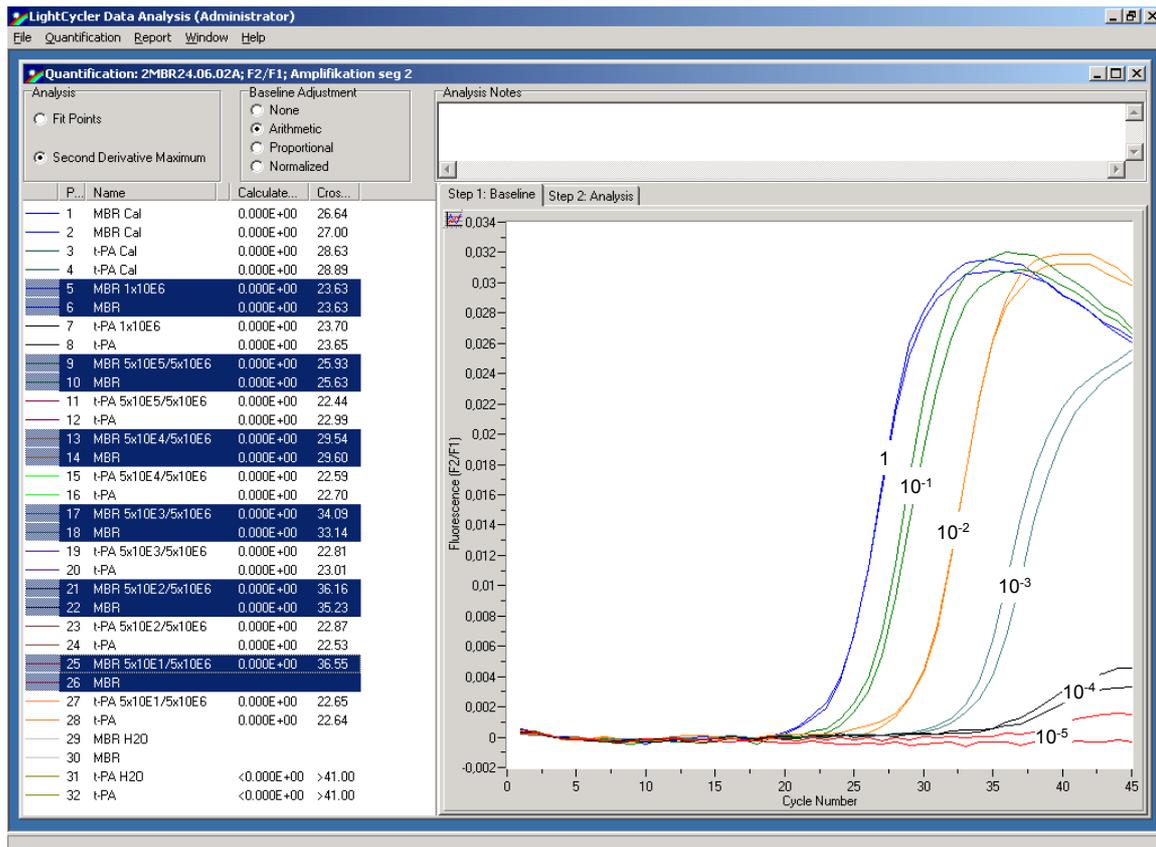


Abbildung 14: „Real-time“ PCR der K422-Verdünnungen im LightCycler®. 10-fache Verdünnungen von 5×10^5 bis 5 der t(14;18)-positiven K422 Zellen in 5×10^6 normalen MNC wurden nach MagNA Pure Extraktion im LightCycler® in Doppelbestimmung amplifiziert. Die PCR-Fluoreszenz-Kurven sind entsprechend der Verdünnung gekennzeichnet.

Der Vergleich des automatischen MagNA-Pure-Extraktionsverfahrens mit der manuellen Qiagen-Extraktion zeigte eine annähernd gleiche Sensitivität (Abb. 15), so dass aufgrund der einfacheren und schnelleren Durchführbarkeit alle weiteren Experimente mit dem MagNA Pure LC-Roboter durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen sowie des Vergleichs der Extraktionsverfahren sind in Tab. 3 zusammengefasst.

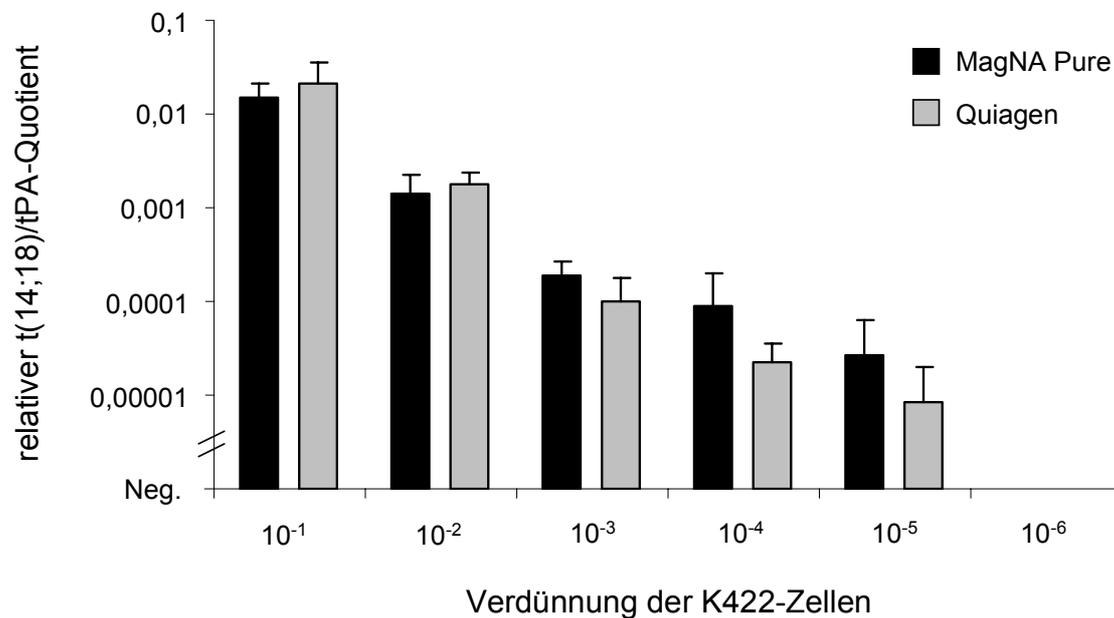


Abbildung 15: Einfluss verschiedener Extraktionsverfahren auf die PCR-Sensitivität. 10-fache Verdünnungen von 5×10^5 bis 5 der t(14;18)-positiven K422 Zellen in 5×10^6 normalen MNC wurden nach DNA-Extraktion mit MagNA Pure oder Qiagen im LightCycler[®] getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der in der RQ-PCR gemessenen t(14;18)/tPA-Quotienten aus drei Experimenten.

Tabelle 3: Sensitivität mit verschiedenen PCR- und Extraktionsmethoden.

	LightCycler [®]	„nested“ PCR
MagNA Pure	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Qiagen	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵

3.1.2 Linearer Messbereich

Mit dieser Analyse gingen wir der Frage nach, ob die quantitative PCR-Methode mit dem LightCycler® über alle DNA-Konzentrationsbereiche hinweg vergleichbare Resultate liefert, sprich linear ist, oder ob das Verfahren unter- oder oberhalb bestimmter DNA-Konzentrationen die Menge an t(14;18)-positiven Zellen über- oder unterschätzt.

Der lineare Messbereich wurde mit Hilfe von DNA aus 1×10^6 K422-Zellen bestimmt. Die DNA wurde seriell 1:10 in MS-2 Phagen-RNA verdünnt und in der RQ-PCR amplifiziert. Der Vergleich der geschätzten Werte mit den Messwerten ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ (Abb. 16). Der lineare Messbereich der Methode befand sich zwischen den „Crossing Points“ 23 und 37 und deckte einen vier Zehnerpotenzen umfassenden Bereich ab, was Verdünnungen zwischen 10^0 und 10^{-4} der ursprünglichen Probe entsprach. Oberhalb Verdünnungen von 10^{-4} wurde die Menge an t(14;18)-positiven Zellen überbewertet.

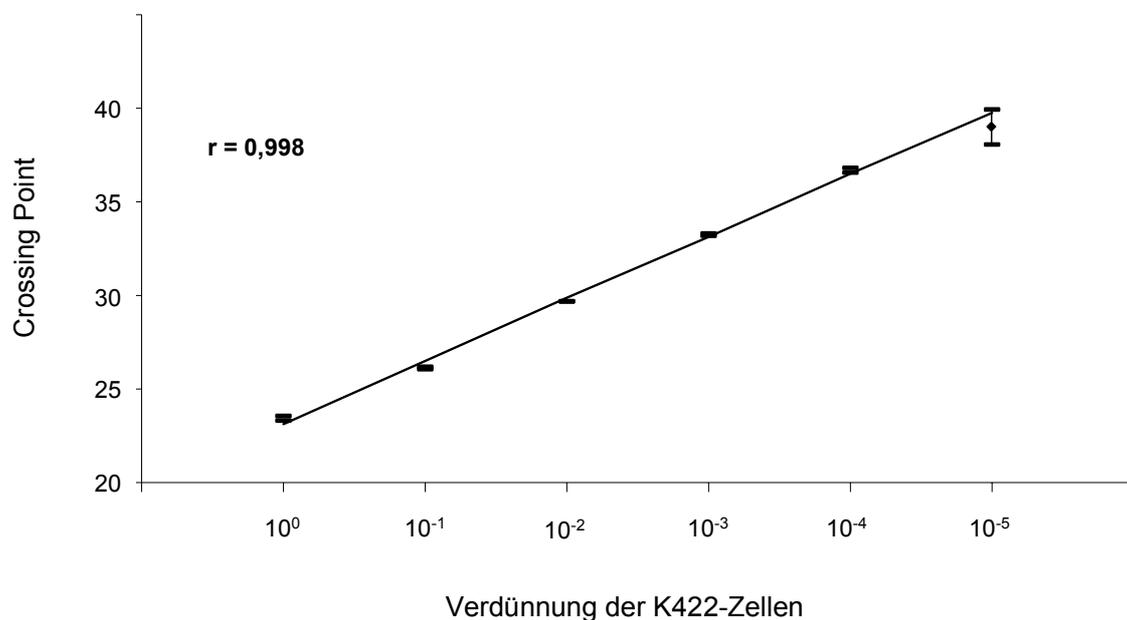


Abbildung 16: Linearer Bereich der Amplifizierung. DNA aus 1×10^6 K422-Zellen wurde 1:10 in MS-2 RNA verdünnt und in der RQ-PCR amplifiziert. Die Proben wurden in zwei verschiedenen Experimenten analysiert. Dargestellt sind die geschätzten Werte und Mittelwerte.

3.1.3 Grenze der Quantifizierung

Für die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze mit der RQ-PCR wurde DNA aus 5×10^6 Zellen aus fünf MBR-positiven Patienten in vier aufeinanderfolgenden Schritten 1:3 in MS-2 RNA verdünnt und im LightCycler[®] überprüft. Bis zu einer Verdünnung von 1:9 (Abb. 17) konnte ein positives Signal gemessen werden. Bei einer Verdünnung von 1:3 war der mediane $t(14;18)/tPA$ -Quotient zweimal größer und bei einer Verdünnung von 1:9 dreimal größer im Vergleich zur unverdünnten DNA. Dies zeigt, dass die $t(14;18)/tPA$ -Quotienten bei niedrigeren DNA-Ausgangskonzentrationen etwas zu hoch ausfallen.

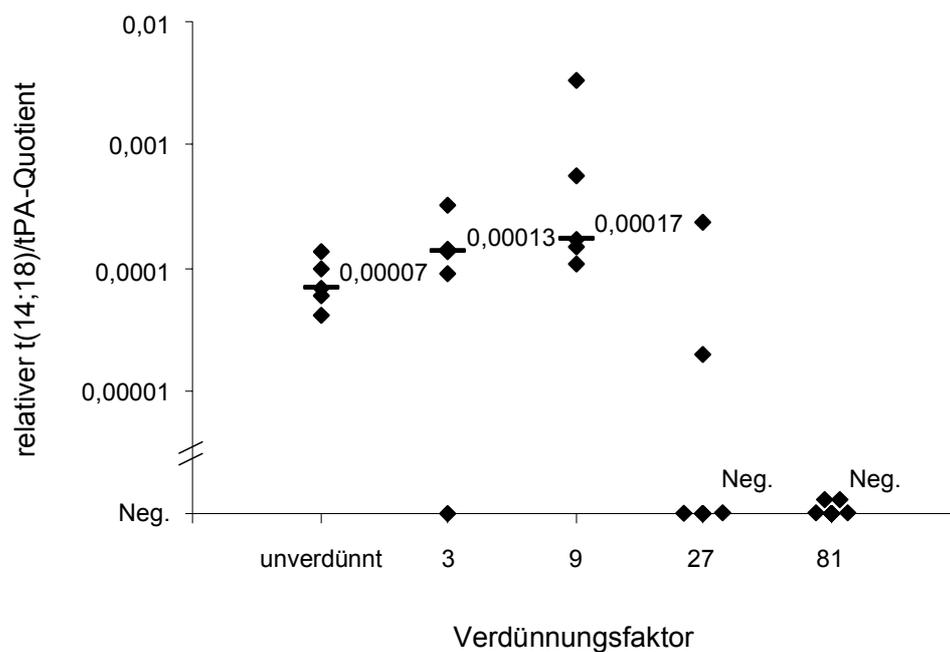


Abbildung 17: Grenze der Quantifizierung. DNA aus 5×10^6 $t(14;18)$ -positiven Zellen wurde mit MS-2 Phagen RNA 1:3 verdünnt und in der RQ-PCR analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Proben von fünf MBR-positiven Patienten.

3.1.4 Intra- und Inter-Test-Variabilität

Zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit der RQ-PCR wurde überprüft, ob identische Proben, die parallel im gleichen Lauf (Intra-Test) oder nacheinander in verschiedenen Läufen (Inter-Test) analysiert wurden, zu unterschiedlich gemessenen $t(14;18)$ -Mengen führten.

Zur Überprüfung der Intra-Test-Variabilität wurden je sechs Replikate von zwei Patientenproben dreimal im selben Versuch quantifiziert. Dabei rangierte der Variationskoeffizient innerhalb einer Untersuchung zwischen 0,12 und 0,44 (Median 0,16) (Abb. 18a). Die Inter-Test-Variabilität wurde mit je sechs Replikaten zweier Patientenproben in drei separaten LightCycler®-Läufen überprüft. Der mediane Variationskoeffizient zwischen unterschiedlichen Untersuchungen lag bei 0,22 (Bereich 0,08 – 0,45) (Abb. 18b).

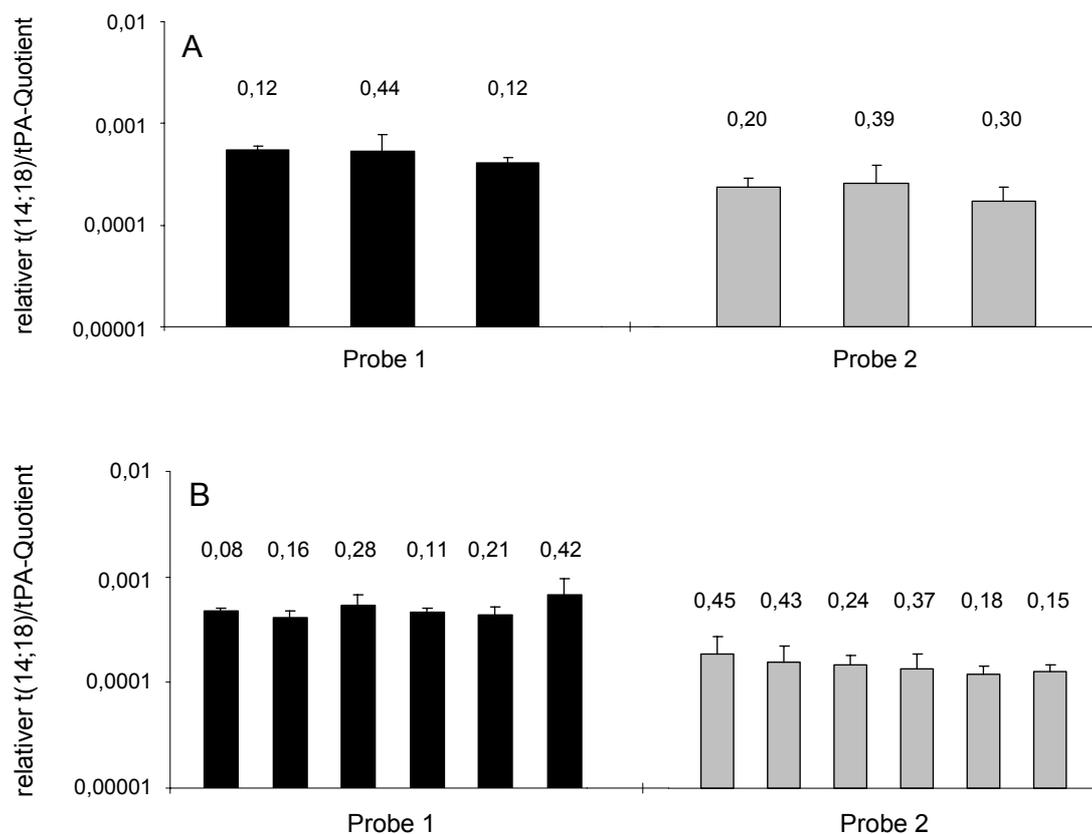


Abbildung 18: Intra- und Inter-Test-Variabilität. Je sechs Replikate zweier Proben wurden dreimal im selben Versuch (**A**) bzw. in drei separaten RQ-PCRs (**B**) auf $t(14;18)$ -positive Zellen getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der $t(14;18)/tPA$ -Quotienten sowie die jeweiligen Variationskoeffizienten.

3.2 Klinische Evaluation der RQ-PCR mit dem LightCycler®

3.2.1 *Quantifizierung der t(14;18)-positiven Zellen im Knochenmark und peripheren Blut von Patienten mit follikulärem Lymphom*

Zunächst untersuchten wir, ob sich die Menge an t(14;18)-positiven Zellen bei Patienten mit follikulärem Lymphom im Knochenmark (KM) oder peripheren Blut (PB) unterscheidet. Daher wurde auf der Grundlage von 126 gepaarten Proben, die 51 Patienten zum jeweils gleichen Zeitpunkt aus KM und PB entnommen worden waren, eine intraindividuelle Quantifizierung der t(14;18)-positiven Zellen durchgeführt. Die beiden Proben wurden vor Beginn der Therapie, also zu Zeitpunkten mit hoher Tumorlast, sowie während der Therapie zu Zeitpunkten niedriger Tumorlast abgenommen. Aus diesem Grund schwankten die t(14;18)/tPA-Quotienten der KM-Proben zwischen 0,00 und 0,27, während die Quotienten der PB-Proben im Bereich von 0,00 bis 0,055 lagen. 68 der gepaarten Proben aus KM und PB waren in der RQ-PCR in beiden Kompartimenten negativ. Im Hinblick auf die verbleibenden 58 gepaarten Proben mit mindestens einem positiven RQ-PCR-Wert im KM oder PB zeigte die intraindividuelle Quantifizierung eine vergleichbare Menge an Tumorzellen im KM und PB (Median 0,0010 versus 0,00075) (Abb. 19a). Nur in Proben mit t(14;18)/tPA-Quotienten unter 0,0003 wurden relevante Unterschiede zwischen den beiden Kompartimenten gefunden. Dort resultierte die Abweichung aus der PCR-Negativität einer der beiden gepaarten Proben. Der Vergleich zwischen gepaarten Proben, die beide t(14;18)-positiv waren, ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,89$ (Abb. 19b).

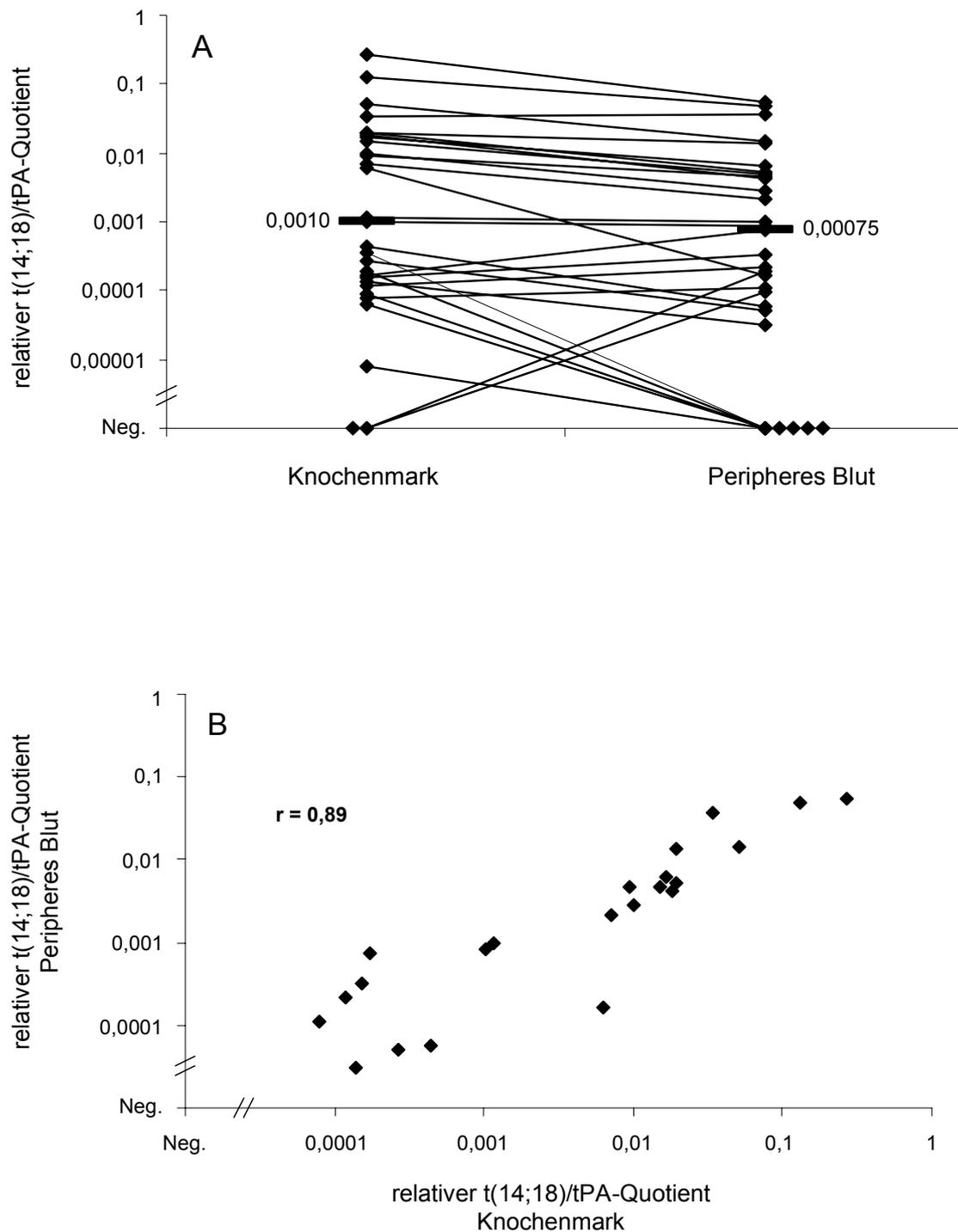


Abbildung 19: Intraindividuelle Evaluierung der Menge t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB. (A) t(14;18)/tPA-Quotienten in 58 gepaarten, zeitgleich entnommenen KM- und PB-Proben. Mediane sind durch horizontale Balken gekennzeichnet. (B) Korrelationsanalyse der t(14;18)/tPA-Quotienten in KM und PB.

3.2.2 *Krankheitsstatus und Patientencharakteristika in Bezug auf die Mengen t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB*

Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war, inwiefern der Nachweis und die Menge der Translokation-positiven Zellen mit herkömmlichen klinischen oder histopathologischen Parametern korreliert. Dazu wurde die Krankheitsphase (Erstdiagnose, Rezidiv), der Remissionsstatus, das Krankheitsstadium, das Geschlecht, der Nachweis großer Lymphknotenverwachsungen sowie die KM-Morphologie der Patienten mit der Menge t(14;18)-positiver Zellen in Bezug gesetzt.

3.2.2.1 *Zusammenhang mit Krankheitsphase und Remissionsstatus*

Die Proben wurden den Patienten sowohl vor der Therapie (Erstdiagnose bzw. Rezidiv) als auch während oder nach der Therapie in klinisch partieller oder kompletter Remission entnommen. Es konnten signifikant unterschiedliche t(14;18)/tPA-Quotienten zwischen Patienten in unterschiedlichen Krankheitsphasen festgestellt werden (Abb. 20). Die höchste Menge an t(14;18)-positiven Zellen im KM oder PB wurde zum Zeitpunkt eines Rezidivs gemessen. Deutlich wurde dies durch einen zehnmal höheren medianen t(14;18)/tPA-Quotienten als bei Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Zusätzlich hatten Patienten mit Rezidiv eine signifikant höhere Anzahl t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB verglichen mit Patienten in CR ($p = 0,002$ für KM; $p = 0,001$ für PB) oder PR ($p = 0,03$ für PB). Ebenso der Vergleich zwischen Patienten in CR mit Patienten in PR zeigte, dass Patienten in PR einen höheren medianen t(14;18)/tPA-Quotienten im PB hatten ($p = 0,02$).

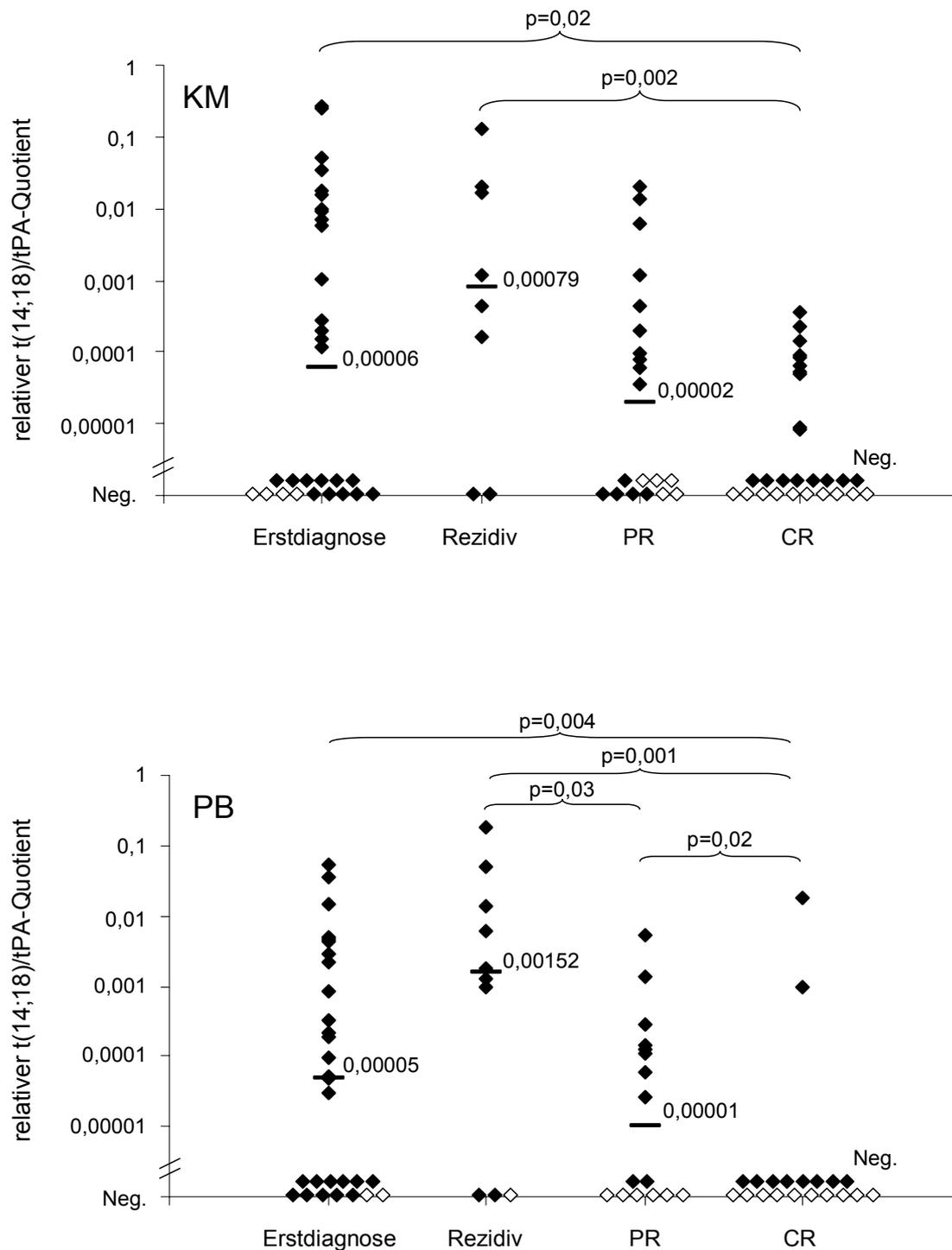


Abbildung 20: Assoziation der t(14;18)/tPA-Quotienten mit der Krankheitsphase. t(14;18)/tPA-Quotienten von 52 Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, des Rezidivs sowie partieller (PR) oder kompletter Remission (CR). Horizontale Balken kennzeichnen die medianen t(14;18)/tPA-Quotienten. Schwarze Rauten entsprechen den in der „nested“ PCR positiven Proben, weiße Rauten den in der „nested“ PCR negativen Proben.

3.2.2.2 Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium

Bei 33 neu-diagnostizierten Patienten wurde die Menge an t(14,18)-positiven Zellen im KM und PB mit dem Krankheitsstadium in Bezug gesetzt. Der mediane Wert von Patienten im Stadium IV war höher als der der Patienten in den Stadien II und III, und zwar in beiden Kompartimenten, KM (0,00015 versus 0, $p = 0,276$) und PB (0,00012 versus 0, $p = 0,458$) (Abb. 21).

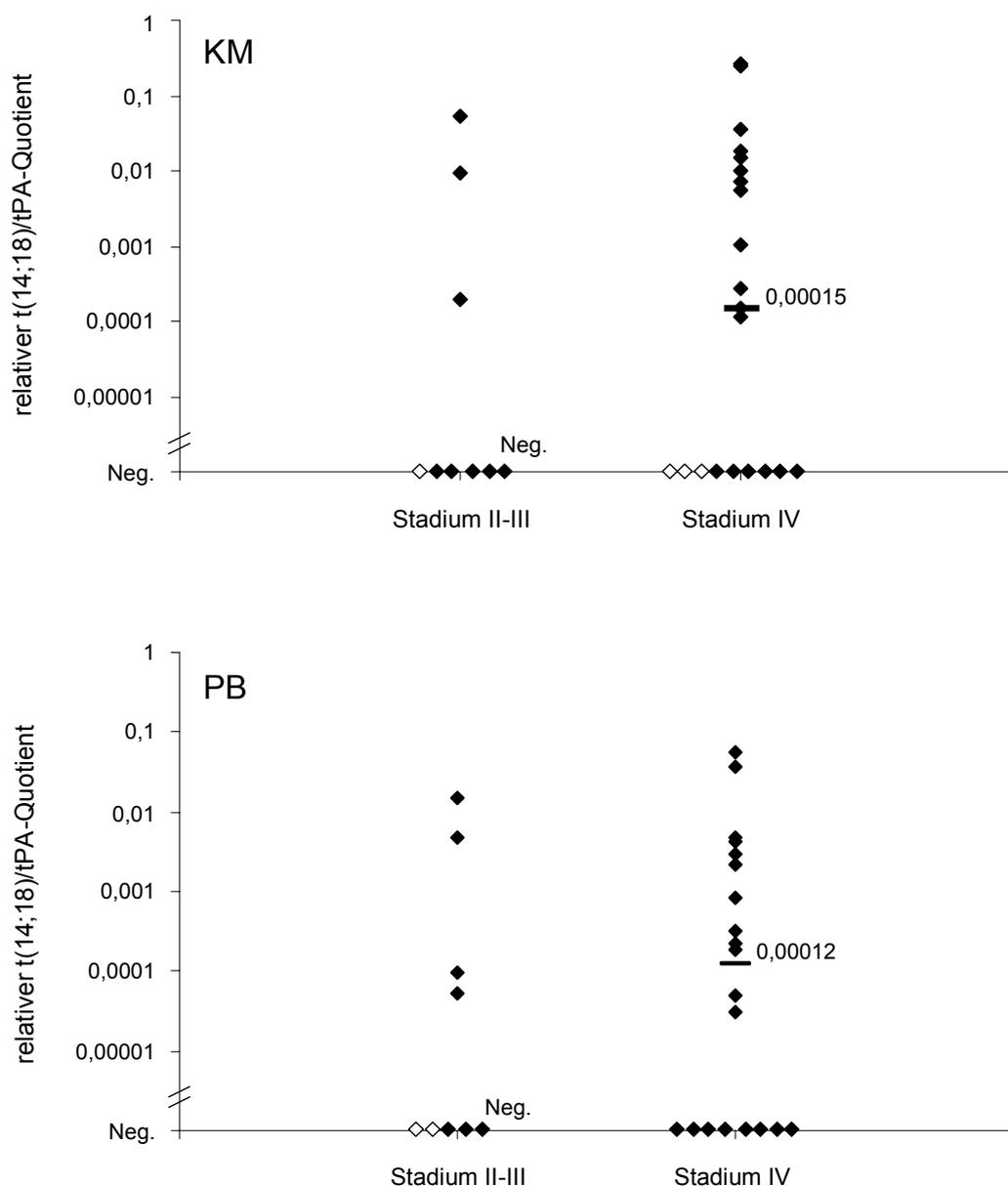


Abbildung 21: Assoziation der t(14;18)/tPA-Quotienten mit dem Krankheitsstadium. (Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

3.2.2.3 *Zusammenhang mit dem Geschlecht*

Ein überraschendes Ergebnis stellte der Vergleich der t(14;18)-positiven Zellen zwischen Männern und Frauen dar. Zum Zeitpunkt der Diagnose konnten bei Männern höhere t(14;18)/tPA-Quotienten gemessen werden als bei Frauen (KM Median 0,00027 versus 0, p = 0,056) (Abb. 22). Dieses Ergebnis war grenzwertig signifikant.

3.2.2.4 *Zusammenhang mit einer „bulky disease“*

Ferner untersuchten wir an 30 Patienten, ob die Menge an t(14;18)-positiven Zellen im KM vom Vorhandensein großer Lymphknotenpakete („bulky disease“) abhängt. Interessanterweise zeigten Patienten mit „bulky disease“ geringere Werte an t(14;18)-positiven Zellen (Median 0) als solche ohne (Median 0,00012, p = 0,434) (Abb. 23).

3.2.2.5 *Zusammenhang mit der KM-Morphologie*

Zum Vergleich der RQ-PCR Ergebnisse mit den Daten der KM-Morphologie wurde die Menge t(14;18)-positiver Zellen von 25 Patienten, bei denen zur gleichen Zeit eine histopathologische Untersuchung vorlag, analysiert. Entsprechend der histopathologischen Ergebnisse war die Menge Translokation-positiver Zellen in den KM-Proben mit nachgewiesener KM-Infiltration höher (Median 0,00021) als in histologisch negativen Proben (Median 0) (Abb. 24). Bemerkenswert war, dass 60% der Patienten mit histologisch diagnostizierter KM-Beteiligung ebenso quantifizierbare Mengen an zirkulierenden bcl-2-positiven Zellen aufwiesen. Hier konnten t(14;18)/tPA-Quotienten im Bereich zwischen 0,00003 und 0,055 (Median 0,00019) gemessen werden.

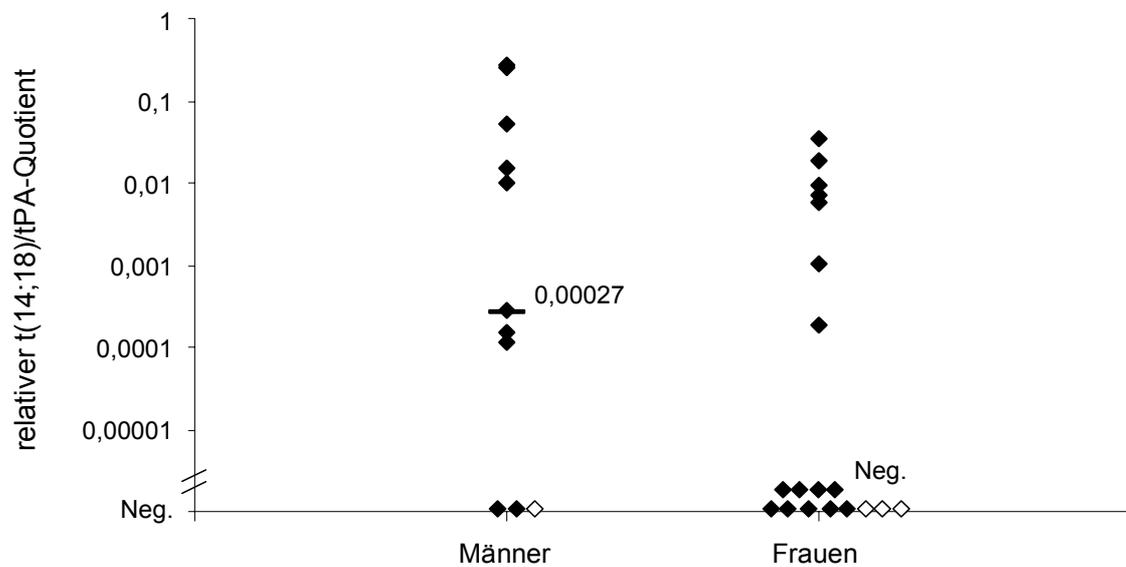


Abbildung 22: Assoziation der t(14;18)/tPA-Quotienten im KM zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit dem Geschlecht. (Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

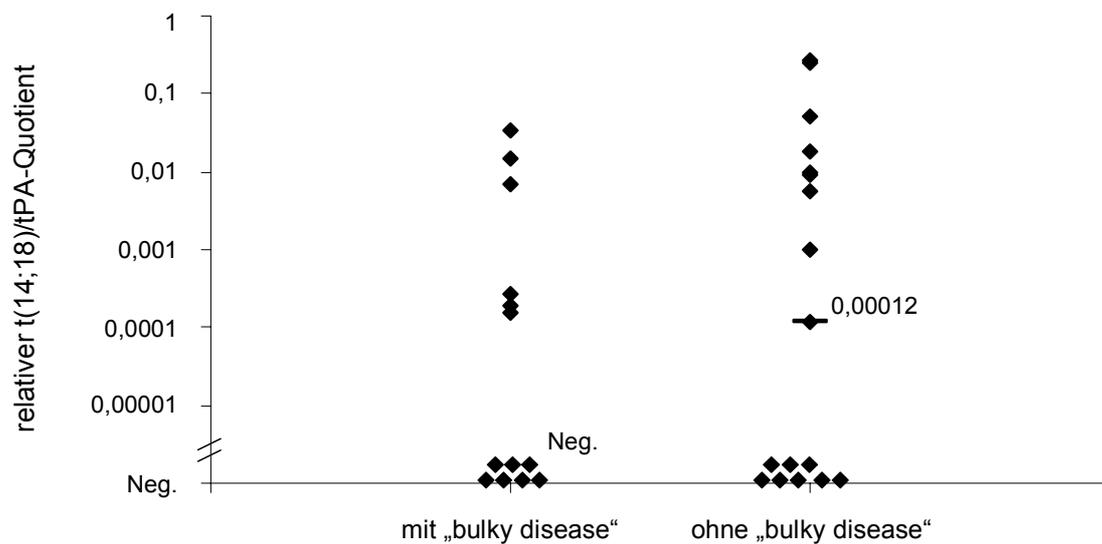


Abbildung 23: Assoziation der t(14;18)/tPA-Quotienten im KM mit der Diagnose einer „bulky disease“. (Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

3.2.3 *Serielles molekulares Monitoring durch t(14;18)-RQ-PCR während der Therapie von Patienten mit follikulärem Lymphom*

Nun sollte der Wert der neuen Methode für die klinische Anwendung zur Messung des Therapieerfolgs auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierfür wurde mit der RQ-PCR das Ausmaß der Tumorzellzerstörung im KM und PB infolge verschiedener Therapieregime analysiert. Die Patienten wurden in zwei verschiedene Gruppen, Erstdiagnose oder Rezidiv eines follikulären Lymphoms, eingeteilt.

3.2.3.1 *Therapie der Patienten mit Erstdiagnose*

Patienten, bei denen wir erstmalig ein follikuläres Lymphom diagnostizierten, wurden innerhalb einer Studie behandelt, in der sie randomisiert auf zwei unterschiedliche Therapiearme zugeteilt wurden (vgl. Abb. 7). Im ersten Arm wurden die Proben jeweils nach den ersten drei Zyklen R/FM bzw. nach den folgenden drei Zyklen R/FM abgenommen, während im zweiten Arm die Abnahme jeweils nach drei Zyklen R/CHOP, nach den folgenden zwei Zyklen R/HAM und nach Hochdosis-R/BEAM mit ABSZT stattfand. Daraus ergaben sich 93 Proben von 25 Erstdiagnose-Patienten, die den beiden Therapiearmen entsprechend behandelt wurden. Bereits nach drei Zyklen R/CHOP fiel das mediane t(14;18)/tPA-Niveau im KM und PB um zwei Zehnerpotenzen auf null ab (KM Median 0, Bereich 0 – 0,00044; PB Median 0, Bereich 0 – 0,00097) (Abb.25a). Allerdings blieben 50% der Patienten mit negativem Ergebnis in der RQ-PCR positiv in der sensitiveren „nested“ PCR. Die Fortführung der Behandlung mit zweimal R/HAM und R/BEAM mit ABSZT konnte die t(14;18)-positiven Zellen bei allen Patienten unter der Nachweisgrenze halten und führte nun auch zu negativen Ergebnissen in der „nested“ PCR.

Die Patienten mit R/FM-Therapie zeigten nach drei Zyklen eine Reduzierung des medianen „Levels“ t(14;18)-positiver Zellen um den Faktor 3 im KM (0,00012 versus 0,00004) und um den Faktor 2 im PB (0,00011 versus 0,00006). Nach sechs Zyklen des R/FM-Regimes konnten im KM und PB keine t(14;18)-positiven Zellen mehr durch RQ-PCR gemessen werden. Die „nested“ PCR war jedoch noch bei 50% der Patienten positiv (Abb. 25b).

Nach dem jeweils letzten Zyklus der beiden Therapiearme befanden sich alle Patienten in klinisch kompletter Remission.

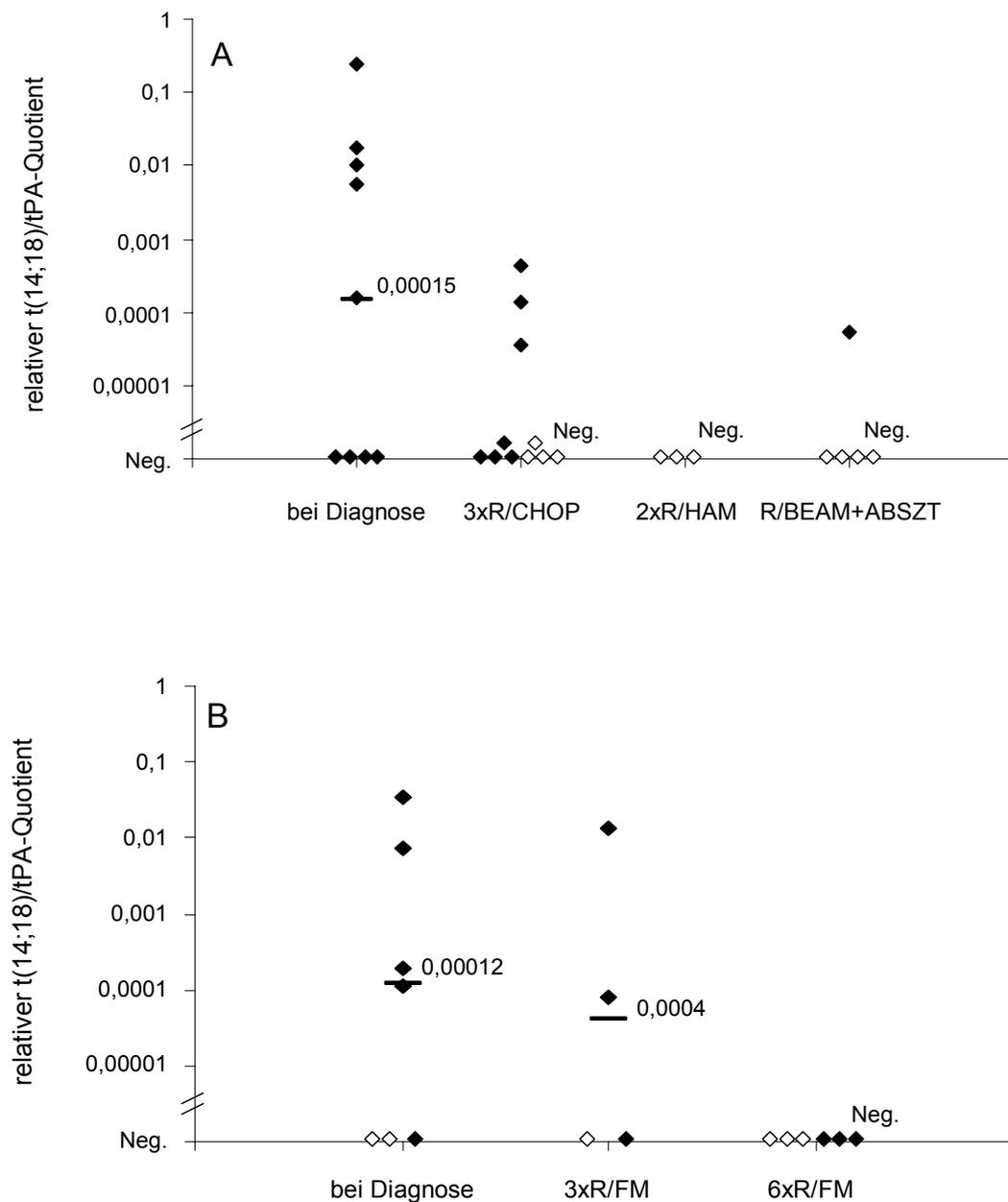


Abbildung 25: Serielles quantitatives Monitoring der t(14;18)-positiven Zellen im KM von in zwei Therapiearmen behandelten Patienten mit Erstdiagnose eines folliculären Lymphoms. **(A)** Behandlung mit 3xR/CHOP, 2xR/HAM, Hochdosistherapie mit R/BEAM und ABSZT. **(B)** Behandlung mit je 3xR/FM. (Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

Abb. 26 verdeutlicht exemplarisch an zwei Patienten den Verlauf der Menge t(14;18)-positiver Zellen nach der jeweiligen Therapie. Die Verläufe bestätigen die vergleichbaren Mengen t(14;18)-positiver Zellen im KM sowie PB und belegen die stärkere Wirkung der CHOP-Chemotherapie in Kombination mit Rituximab. Doch auch die R/FM-Immun-Chemotherapie führt zu einer, wenngleich schwächeren, Reduzierung der Translokation-positiven Zellen im KM und PB.

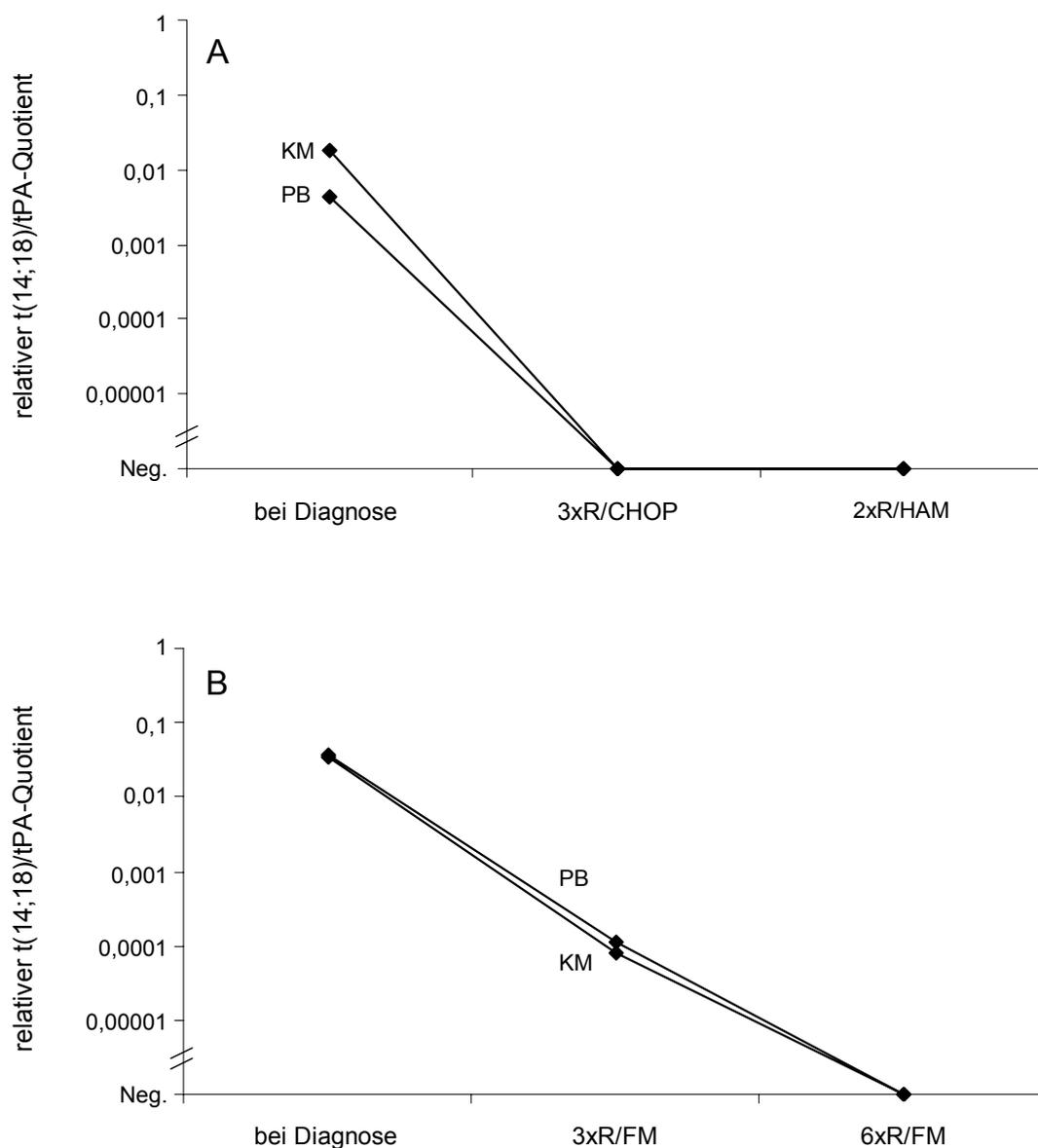


Abbildung 26: Verlauf der Menge t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB exemplarisch dargestellt an je einem Patienten nach (A) R/CHOP- bzw. (B) R/FM-Chemo-Immuntherapie

3.2.3.2 Therapie der Patienten mit Rezidiv

Die RQ-PCR wurde von uns ebenfalls angewandt, um auf molekularer Ebene die Wirksamkeit der Behandlung von 12 Patienten mit Rezidiv zu bewerten. Die Patienten erhielten zwei Zyklen R/HAM gefolgt von R/BEAM mit Stammzelltransplantation. Bereits nach der Gabe der beiden R/HAM-Chemotherapie-Zyklen zeigte sich im KM und PB dieser Patienten ein Rückgang der medianen $t(14;18)/tPA$ -Quotienten um zwei Zehnerpotenzen (KM median 0,0084 versus 0,00005; PB median 0,00364 versus 0,00001). Erst das Hochdosis-BEAM bewirkte im KM sowie im PB ein Absinken der residualen Lymphomzellen unter die Nachweisgrenze. Die Überprüfung der RQ-PCR-negativen Proben mit der „nested“ PCR bestätigte in vier von fünf Patienten eine molekulare Remission (Abb. 27). Nach der Hochdosistherapie befanden sich alle Patienten in klinisch kompletter Remission.

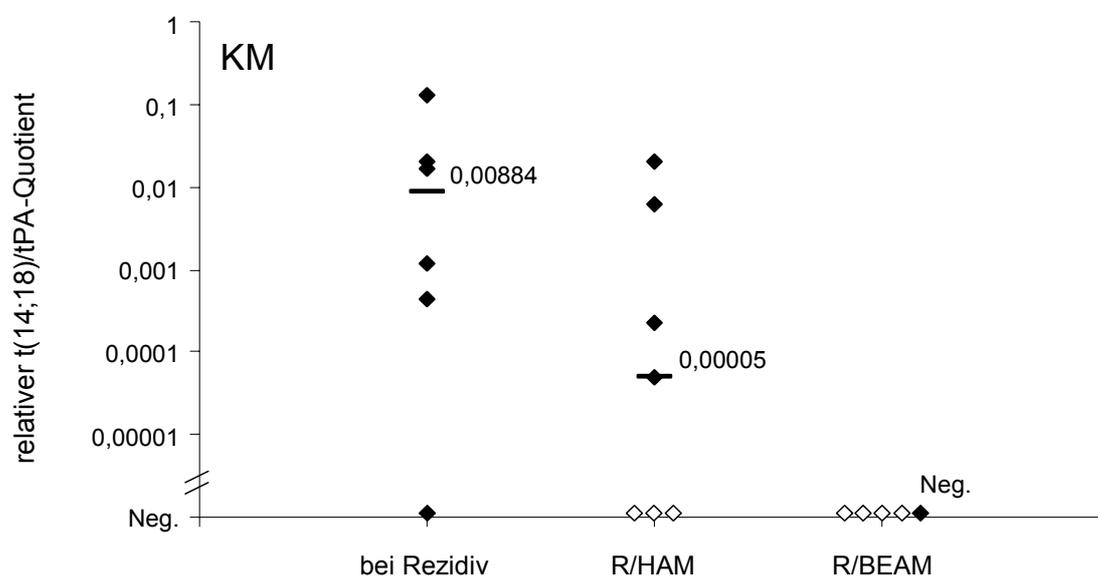


Abbildung 27a: Serielles quantitatives Monitoring der $t(14;18)$ -positiven Zellen im KM von Patienten mit Rezidiv eines follikulären Lymphoms, die mit R/HAM und R/BEAM-Hochdosistherapie mit Blutstammzelltransplantation behandelt wurden.

(Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

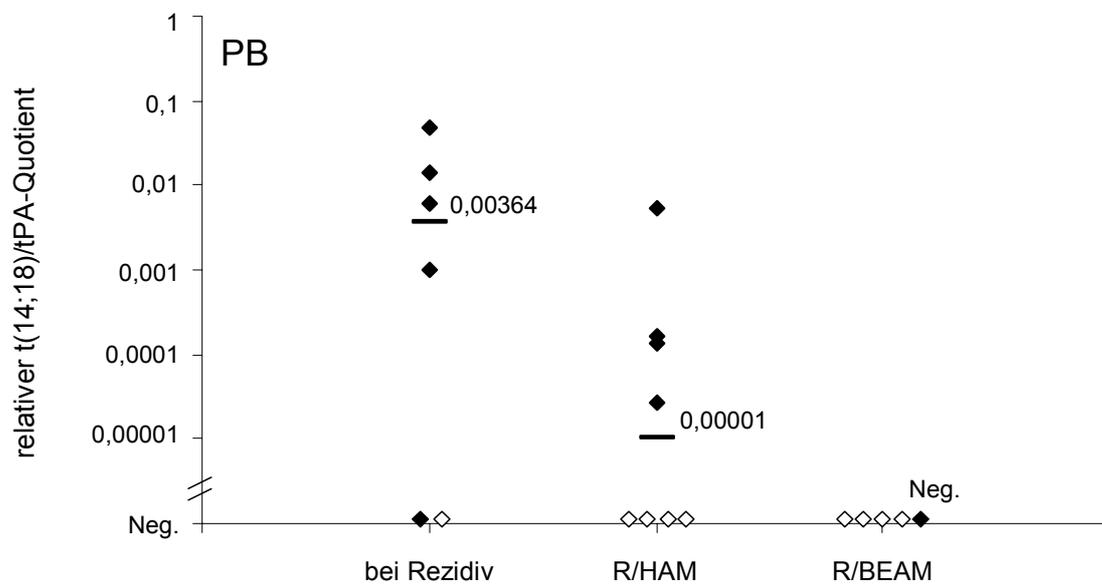


Abbildung 27b: Serielles quantitatives Monitoring der t(14;18)-positiven Zellen im PB von Patienten mit Rezidiv eines follikulären Lymphoms, die mit R/HAM und R/BEAM-Hochdosistherapie mit Blutstammzelltransplantation behandelt wurden. (Kennzeichnungen entspr. Abb. 20)

4. DISKUSSION

Für die Therapie des follikulären Non-Hodgkin-Lymphoms spielt die Bewertung einer minimalen Resterkrankung (MRD) eine entscheidende Rolle, da das Vorhandensein der Translokation t(14;18) im Knochenmark und peripheren Blut als wichtiger Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben gilt^{42,66,67}. Es wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Anzahl t(14;18)-tragender Zellen in Patienten mit follikulärem Lymphom zu messen und damit die Wirksamkeit der Behandlung oder neuer Therapiemöglichkeiten auf molekularer Ebene zu evaluieren⁷⁷⁻⁸⁰. Arbeitsintensive und mit hohem Kontaminationsrisiko beladene Prozeduren wie beispielsweise das „limiting dilution“-Verfahren oder die kompetitive PCR wurden durch die quantitative „real-time“ PCR ersetzt, die eine schnelle Probenanalyse in einem geschlossenen System ermöglicht^{40,45-51,73,74}.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RQ-PCR mit Hilfe der LightCycler[®]-Technologie genaue und reproduzierbare Messungen der t(14;18)-positiven Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut möglich macht. Wir konnten mit dieser Methode in einer Gruppe aus 52 Patienten mit follikulärem Lymphom belegen, dass die Menge t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB ähnlich ist. Zudem konnte der Zusammenhang mit dem Krankheitsstatus und den klinischen Patientencharakteristika gezeigt werden. Darüber hinaus gestattet diese quantitative PCR die serielle molekulare Untersuchung der MRD in Patienten, die eine konventionelle oder dosiserhöhte zytotoxische Chemotherapie in Kombination mit Rituximab erhalten. So kann die Wirksamkeit verschiedener Therapie-modalitäten auf molekularer Ebene bewertet werden. Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals die Wirksamkeit des monoklonalen Anti-CD20-Antikörpers Rituximab in Kombination mit Chemotherapie als Erstlinientherapie bei Patienten mit follikulärem Lymphom auf molekularer Ebene untersucht. Außerdem ist dies der erste Bericht über eine t(14;18)-spezifische LightCycler[®]-basierte RQ-PCR, die außerhalb von Transplantationsprogrammen bei Patienten mit follikulärem Lymphom eingesetzt wurde.

Hinsichtlich der Quantifizierung t(14;18)-positiver Zellen belegen unsere Daten, dass die Sensitivität, die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode

denen der quantitativen PCR mit der TaqMan-Ausrüstung gleichen. Die Sensitivität unserer LightCycler®-basierten RQ-PCR betrug 10^{-5} . Die gleiche Sensitivität ermittelten auch Luthra et al.⁴⁵ und Summers et al.⁷³ unter Verwendung der TaqMan-Technologie. Mandigers et al.⁴⁹ konnten eine Lymphomzelle in 75.000 normalen Zellen finden, während Olsson et al.⁴⁷ über eine Sensitivität von 10^{-4} - 10^{-5} berichteten.

Wir quantifizierten Lymphomzellen im KM und PB von Patienten mit neu-diagnostiziertem oder rezidiertem follikulären Lymphom. Unsere Messungen der gepaarten Proben ergaben ähnliche Mengen an t(14;18)-positiven Zellen in beiden Kompartimenten zu Zeitpunkten hoher und niedriger Tumorlast. Dies lässt auf einen stetigen Austausch der Tumorzellen zwischen KM und PB schließen, wodurch sich eine gleichmäßige Verteilung zwischen den beiden hämatopoetischen Kompartimenten ergibt. Da in den meisten Fällen das PB in gleicher Weise wie das KM Rückschluss auf die Menge der t(14;18)-positiven Zellen zu verschiedenen Krankheitsstadien erlaubte, scheint es angesichts der Sensitivität der RQ-PCR möglich, nur das PB für die quantitative molekulare Diagnostik zu verwenden. Insbesondere die im Vergleich aufwendige Gewinnung der Knochenmarkaspirate bekräftigt diese Überlegung. Auch Summers et al.⁵¹, die die TaqMan RQ-PCR einsetzten, konnten in 79% der während der Remission abgenommenen Proben und in 72% der gepaarten Proben aus Phasen ohne Remission Unterschiede der t(14;18)-Werte von höchstens einer Zehnerpotenz feststellen.

Ebenso im Hinblick auf die klinischen Charakteristika der Patienten untersuchten wir deren KM und PB auf die Menge an t(14;18)-positiven Lymphomzellen. Unsere RQ-PCR Messungen ergaben, dass die Anwesenheit und Quantität t(14;18)-positiver Zellen mit der Lymphomaktivität signifikant korrelierten. Im Gegensatz zu Patienten in klinischer Remission konnten wir in Patienten ohne Remission signifikant höhere Mengen an t(14;18)-positiven Zellen nachweisen. Befanden sich die Patienten innerhalb der Gruppe ohne Remission im Rezidiv, konnten zehnmal höhere Mengen an t(14;18)-positiven Zellen gefunden werden als zum Diagnosezeitpunkt. Bei den Patienten in klinischer Remission wiesen diejenigen in partieller Remission ebenfalls höhere Werte auf als die in Vollremission. Die Patienten mit Erstdiagnose eines follikulären Lymphoms hatten je nach Stadium bei Diagnosestellung unterschiedliche Mengen t(14;18)-positiver Zellen. Wir beobachteten höhere Werte bei den Patienten im fortgeschrittenen Stadium IV als bei denen in

den Stadien II und III. Diese unterschiedlichen Mengen t(14;18)-positiver Zellen gehen möglicherweise auf eine Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen zurück, die eine Loslösung vom Tumor ermöglichen. In diesem Zusammenhang beobachteten Terol et al. bei Patienten mit NHL, dass niedrigere Werte des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 mit einer schlechteren Prognose und einem generalisierten Krankheitsbild einhergingen⁸¹.

Beachtenswert sind die höheren Mengen an t(14;18)-positiven Zellen in männlichen Patienten. Frühere Daten zeigten für das männliche Geschlecht eine schlechtere Prognose nach Hochdosistherapie mit peripherer Blutstammzelltransplantation, da im Vergleich zu Frauen eine um 30% höhere Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs bestand⁸². Die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht bekannt, jedoch lassen die Erkenntnisse die Zugehörigkeit zum männlichen Geschlecht als Risikofaktor erscheinen.

Interessant war, dass die Tumorzell-Quantifizierung die histopathologische Diagnose des Knochenmarks bestätigte, da histologisch positive Proben mehr t(14;18)-positive Zellen enthielten als solche aus morphologisch unauffälligem KM. Zu diesem Resultat gelangten auch Mandigers et al.⁴⁹ unter Verwendung der Taq-Man-Methode.

Bis heute sind die Daten über das Auftreten und die Stellung t(14;18)-positiver Zellen in Patienten mit follikulärem Lymphom begrenzt und nur wenige Patienten wurden innerhalb von Studien behandelt. Aus diesem Grund nehmen wir im folgenden Stellung zur Bedeutung der RQ-PCR in der Bewertung der Wirksamkeit verschiedener Immun-Chemotherapien. Mit Hilfe dieser speziellen PCR untersuchten wir zu festen „Staging“-Zeitpunkten die Proben aus KM und PB, um das „In-vivo-Purgung“-Potential unterschiedlicher Chemotherapien einzustufen. Der Vergleich zweier Therapiearten im Rahmen einer randomisierten Studie ergab deutliche Differenzen bei der Zerstörung der Tumorzellen. Nach der konventionellen Behandlung der Erstdiagnosepatienten mit drei Zyklen R/CHOP konnten wir einen deutlichen Rückgang der t(14;18)-positiven Zellen sowohl im KM als auch im PB beobachten, da die medianen t(14;18)/tPA-Quotienten um zwei Zehnerpotenzen bis unter die Nachweisgrenze der RQ-PCR sanken. Für Proben mit negativem RQ-PCR-Ergebnis wurde eine Tumorzellzahl unter 10^{-5} angenommen. Im Gegensatz dazu verringerte sich der mediane t(14;18)/tPA-Quotient im KM und PB nach Verabreichung von drei Zyklen R/FM nur um zwei Drittel bzw. die Hälfte.

Ausgehend von einer vergleichbaren Tumorlast in den beiden Patientengruppen vor Therapiebeginn scheint R/CHOP eine größere „Purging“-Fähigkeit zu haben als R/FM.

Nach der Gabe der folgenden Zyklen R/HAM sowie des Hochdosis-R/BEAMs sanken die t(14;18)-Werte unter die Nachweisgrenze der RQ-PCR. Vier von fünf dieser Patienten waren ebenso in der „nested“ PCR negativ. Nach sechs Zyklen R/FM sank auch hier der mediane t(14;18)/tPA-Quotient unter die Nachweisgrenze, jedoch waren noch 50% der Patienten in der „nested“ PCR positiv. Dies zeigt die zerstörerische Wirkung, die die sequentielle Hochdosistherapie auf die Tumorzellen hat. Trotz der geringen Patientenzahl weisen unsere Daten darauf hin, dass die Hochdosistherapie in Kombination mit Rituximab bei mehr Patienten zu einer molekularen Remission führt als die konventionelle Chemo-Immuntherapie mit sechs Zyklen R/FM. Bemerkenswert ist jedoch, dass die FM-Chemotherapie mit Zusatz des Antikörpers zu vergleichbaren Remissionsraten führt wie eine Hochdosisbehandlung ohne Rituximab. So blieben in einer früheren Studie ebenfalls 50% der Patienten nach Hochdosistherapie und ABSZT in der „nested“ PCR positiv⁶⁷. Dies bestätigt In-vitro-Experimente, in denen die Kombination des Antikörpers mit Chemotherapie synergistische Wirkungen entwickelte⁴¹.

In der Gruppe der Patienten mit Rezidiv wurde nach R/HAM-Therapie im KM und PB eine Reduzierung der Tumorzellmenge um den Faktor 100 beobachtet. Nach Hochdosistherapie mit R/BEAM und Stammzelltransplantation konnten in der RQ-PCR keine t(14;18)-positiven Zellen mehr nachgewiesen werden und die „nested“ PCR zeigte in 80% der Patienten eine molekulare Remission. Daher besitzt die Chemo-Immuntherapie sogar in Patienten mit Rezidiv oder refraktärer Erkrankung eine effektive „In-vivo-Purging“ Fähigkeit. Sie führt nicht nur zu klinischen, sondern auch zu molekularen kompletten Remissionen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Wirksamkeit verschiedener Therapien sowie deren Ansprechen beim Patienten eng mit der Menge t(14;18)-positiver Zellen zusammenhängen und mit der RQ-PCR genau bewertet werden können.

Ausdrücklich soll hier auf die in der RQ-PCR negativen Proben eingegangen werden. Bei Überprüfung der Messwerte in der „nested“ PCR blieben 50% der nach R/CHOP und R/FM in der RQ-PCR negativ gemessenen Proben positiv. Obwohl die quantitative PCR in Bezug auf die Tumorkinetik der beiden Kompartimente aussagekräftiger ist, unterliegt sie der doppelschrittigen „nested“ PCR, die

eine t(14;18)-positive Zelle in bis zu 10^6 normalen Zellen nachweisen kann. Residuelle chemoresistente Lymphomzellen bilden den Ursprung von Rezidiven und sollen daher mit dem Ziel einer molekularen Remission eliminiert werden. Für eine zuverlässige Prüfung dieses Therapieziels sollte daher eine Bestätigung der RQ-PCR-Negativität in der „nested“ PCR erfolgen. Noch ist die Bedeutung der unterschiedlichen Resultate dieser beiden Verfahren in der „Grauzone“ zwischen 10^{-5} und 10^{-6} unklar, da für die Diagnose einer klinisch relevanten MRD bis jetzt keine genauen Grenzwerte festgelegt worden sind. Dies muss in weiteren Studien analysiert werden. Dennoch gestattet die Quantifizierung residueller Lymphomzellen in „nested“ PCR-positiven Patienten eine weitaus differenziertere Abschätzung des Behandlungserfolgs sowie der Therapiewirksamkeit.

Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Studie erbringt den Nachweis, dass die RQ-PCR mit dem LightCycler® eine geeignete Methode für die Quantifizierung t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB von Patienten mit follikulärem Lymphom darstellt. Die beschriebenen Ergebnisse unterstreichen den Nutzen der quantitativen PCR, den Behandlungserfolg patientenspezifisch festzustellen und zu bewerten. Tatsächlich weist die Menge t(14;18)-positiver Zellen einen engen Bezug zu klinischen Befunden der Patienten auf und reflektiert deren Antwort auf Chemo-Immuntherapie.

Somit kann die LightCycler® basierte RQ-PCR alternativ zur TaqMan-Technologie verwendet werden, um die Menge t(14;18)-positiver Zellen in Patienten mit follikulärem Lymphom zu untersuchen. Diese Arbeit bildet außerdem die Grundlage für weitergehende Untersuchungen bezüglich der Vorhersagbarkeit von Rezidiven, der Steuerung interventioneller Therapien sowie der Möglichkeit prognostischer Aussagen. Ergebnisse früherer Studien weisen auf einen Zusammenhang PCR-positiver Proben mit der Rezidiv- und Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit follikulärem Lymphom hin^{42,66,67} und müssen gleichsam mit Hilfe größerer Patientenzahlen für die RQ-PCR überprüft werden.

Bei Patienten mit follikulärem Lymphom könnte die quantitative molekulargenetische Untersuchung der t(14;18)-positiven Zellen in Zukunft zum Standard

gehören und die bisherige Diagnostik komplementieren. So könnten Rezidive schneller erkannt werden und neue Therapien auf breiter Basis anhand vergleichbarer Daten evaluiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die für das folliculäre Lymphom charakteristische Translokation t(14;18) verlagert das Onkogen *bcl-2* auf Chromosom 18 in den Schwerketten-Immunglobulin-Genlocus auf Chromosom 14. Daraus resultiert eine *bcl-2*-Überexpression mit Hemmung der Apoptose während der B-Zell-Entwicklung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die quantitative „real-time“ PCR (RQ-PCR) mit Hilfe der LightCycler[®]-Technologie genaue und reproduzierbare Messungen der t(14;18)-positiven Zellen im Knochenmark (KM) und im peripheren Blut (PB) möglich macht. Dabei wurde die t(14;18)-spezifische MBR („major breakpoint region“)-DNA amplifiziert und die Menge der Translokation-positiven Zellen quantifiziert. Die Methode konnte eine Tumorzelle in 10⁵ normalen mononukleären Zellen nachweisen. Wir prüften den Zusammenhang zwischen molekularbiologisch nachweisbaren t(14;18)-positiven Zellen mit klinischen Parametern wie Knochenmarkinfiltration oder Remissionsstatus und der Behandlung von Patienten mit folliculärem Lymphom.

Hierfür wurden 52 Patienten innerhalb von dreieinhalb Jahren zu verschiedenen Zeitpunkten KM- und PB-Proben entnommen und daraus gewonnene DNA im LightCycler[®] auf die Translokation untersucht. Der Vergleich zwischen KM und PB zeigte ähnliche Werte t(14;18)-positiver Zellen, so dass zukünftig PB-Proben für das molekulare Monitoring ausreichen. Die Menge der t(14;18)-positiven Zellen korrelierte signifikant mit der Krankheitsphase, da wir im Gegensatz zu Patienten mit Erstdiagnose in Patienten mit Rezidiv zehnmal höhere Mengen an t(14;18)-positiven Zellen nachweisen konnten. Bei Erstdiagnose-Patienten im Stadium IV erhielten wir höhere Werte als bei solchen in den Stadien II und III. Proben aus histopathologisch infiltriertem Knochenmark enthielten mehr t(14;18)-positive Zellen als solche aus morphologisch unauffälligem Mark. Darüber hinaus gestattete die quantitative PCR die serielle molekulare Untersuchung einer „minimal residual disease“ (MRD) in Patienten, die eine konventionelle oder dosiserhöhte zytotoxische Chemotherapie in Kombination mit dem monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab (R) erhielten. Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals die Wirksamkeit des Antikörpers in Kombination mit Chemotherapie als Erstlinien-

therapie bei Patienten mit follikulärem Lymphom auf molekularer Ebene untersucht. Im Hinblick auf das „in vivo-Purging“-Potential verschiedener Chemotherapeutika erwies sich die Kombination R/CHOP wirkungsvoller als die Kombination R/FM. Nach Hochdosistherapie mit R/BEAM sanken die t(14;18)-Werte sogar unter die Nachweisgrenze.

Diese Arbeit zeigt, dass die RQ-PCR mit dem LightCycler[®] eine zuverlässige und sensitive Methode zur Quantifizierung t(14;18)-positiver Zellen im KM und PB von Patienten mit follikulärem Lymphom darstellt. Sie erlaubt die Untersuchung des therapeutischen Ansprechens sowie die Evaluation neuer Therapiekonzepte auf molekularer Ebene.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Weisenburger DD. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol.* 1994;5 Suppl 1:19-24.
- (2) Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999;17:3835-3849.
- (3) Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
- (4) Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K et al. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet.* 1974;406-408.
- (5) Stansfeld AG, Diebold J, Noel H et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet.* 1988;1:292-293.
- (6) Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* 1987;316:79-84.
- (7) Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:7439-7443.
- (8) Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* 1985;41:899-906.

- (9) Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med.* 1987;317:1185-1189.
- (10) Albinger-Hegy A, Hochreutener B, Abdou MT et al. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol.* 2002;160:823-832.
- (11) Kronenwett R, Martin S, Niederste-Hollenberg A, Haas R. Molekulare Diagnostik bei Patienten mit follikulärem Non-Hodgkin-Lymphom. In: Roth SL, Ackermann R, Bock W-J, Gabbert HE, Ganzer U, Göbel U et al., eds. *Klinische Onkologie 2000/01.* Düsseldorf: Eigenverlag Prof.Dr.S.L. Roth; 2000:106-111.
- (12) Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell.* 1986;47:19-28.
- (13) Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 1996;88:386-401.
- (14) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985;228:1440-1443.
- (15) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994;124:1-6.
- (16) Limpens J, Stad R, Vos C et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood.* 1995;85:2528-2536.
- (17) Musshoff K. [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]. *Strahlentherapie.* 1977;153:218-221.
- (18) Martin S, Kronenwett R, Niederste-Hollenberg A et al. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in combination with cytotoxic chemotherapy for the treatment of follicular lymphoma. In: Schulze W, ed.

High-Dose Therapy and Transplantation of Hematopoietic Stem Cells.
Vienna: Blackwell Verlag Berlin; 2002:120-127.

- (19) Haas R, Moos M, Karcher A et al. Sequential high-dose therapy with peripheral-blood progenitor-cell support in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994;12:1685-1692.
- (20) Haas R, Moos M, Mohle R et al. High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:149-155.
- (21) Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood.* 1991;77:211-213.
- (22) Haas R, Mohle R, Fruhauf S et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood.* 1994;83:3787-3794.
- (23) Coley W, et al. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigius*). London: John Bale & Sons Publishers; 1909:1-48.
- (24) Overwijk WW, Lee DS, Surman DR et al. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2982-2987.
- (25) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-497.
- (26) Reff ME, Carner K, Chambers KS et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 1994;83:435-445.

- (27) Zhou LJ, et al. CD20 Workshop Panel Report. In: Schlossmann, S.F., Bournsell, L., Gilks, W., et al. (Eds.): Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Oxford University, Oxford UK: 1995.
- (28) Tedder TF, Forsgren A, Boyd AW, Nadler LM, Schlossman SF. Antibodies reactive with the B1 molecule inhibit cell cycle progression but not activation of human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1986;16:881-887.
- (29) Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today.* 1994;15:450-454.
- (30) Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
- (31) Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6:443-446.
- (32) Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 1998;91:1644-1652.
- (33) Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;48:673-683.
- (34) Coiffier B, Haioun C, Ketterer N et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood.* 1998;92:1927-1932.
- (35) Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000;18:317-324.

- (36) Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2457-2466.
- (37) Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195.
- (38) McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
- (39) Hainsworth JD, Burris HA, III, Morrissey LH et al. Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
- (40) Voso MT, Pantel G, Weis M et al. In vivo depletion of B cells using a combination of high-dose cytosine arabinoside/mitoxantrone and rituximab for autografting in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 2000;109:729-735.
- (41) Demidem A, Lam T, Alas S et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm*. 1997;12:177-186.
- (42) Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood*. 1993;81:3449-3457.
- (43) Kneba M, Eick S, Herbst H et al. Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: analysis by direct DNA sequencing. *Cancer Res*. 1991;51:3243-3250.

- (44) Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*. 1997;22:176-181.
- (45) Luthra R, McBride JA, Cabanillas F, Sarris A. Novel 5' exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of t(14;18)(q32;q21) in patients with follicular lymphoma. *Am J Pathol*. 1998;153:63-68.
- (46) Ladetto M, Sametti S, Donovan JW et al. A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients. *Exp Hematol*. 2001;29:183-193.
- (47) Olsson K, Gerard CJ, Zehnder J et al. Real-time t(11;14) and t(14;18) PCR assays provide sensitive and quantitative assessments of minimal residual disease (MRD). *Leukemia*. 1999;13:1833-1842.
- (48) Crawley CR, Foran JM, Gupta RK et al. A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2000;11:861-865.
- (49) Mandigers CM, Meijerink JP, Mensink EJ et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood*. 2001;98:940-944.
- (50) Sarris AH, Jiang Y, Tsimberidou AM et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for monitoring minimal residual disease in patients with advanced indolent lymphomas treated with rituximab, fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone. *Semin Oncol*. 2002;29:48-55.
- (51) Summers KE, Davies AJ, Matthews J et al. The relative role of peripheral blood and bone marrow for monitoring molecular evidence of disease in follicular lymphoma by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 2002;118:563-566.

- (52) Pfitzner T, Reiser M, Barth S et al. Quantitative molecular monitoring of residual tumor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2002;81:258-266.
- (53) Gutzmer R, Mommert S, Kiehl P et al. Detection of clonal T cell receptor gamma gene rearrangements in cutaneous T cell lymphoma by LightCycler-polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2001;116:926-932.
- (54) Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96:3343-3356.
- (55) Elmaagacli AH, Freist A, Hahn M et al. Estimating the relapse stage in chronic myeloid leukaemia patients after allogeneic stem cell transplantation by the amount of BCR-ABL fusion transcripts detected using a new real-time polymerase chain reaction method. *Br J Haematol.* 2001;113:1072-1075.
- (56) Emig M, Saussele S, Wittor H et al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia.* 1999;13:1825-1832.
- (57) Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA. LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res.* 1999;59:3171-3174.
- (58) Mensink E, van de LA, Schattenberg A et al. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol.* 1998;102:768-774.
- (59) Preudhomme C, Revillion F, Merlat A et al. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia.* 1999;13:957-964.

- (60) Stentoft J, Pallisgaard N, Kjeldsen E et al. Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol.* 2001;67:302-308.
- (61) Hochhaus A, Weisser A, La Rosee P et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 2000;14:998-1005.
- (62) Lin F, van Rhee F, Goldman JM, Cross NC. Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood.* 1996;87:4473-4478.
- (63) Merx K, Muller MC, Kreil S et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia.* 2002;16:1579-1583.
- (64) Neumann F, Herold C, Hildebrandt B et al. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2003;70:1-10.
- (65) Voso MT, Hohaus S, Moos M et al. Autografting with CD34+ peripheral blood stem cells: retained engraftment capability and reduced tumour cell content. *Br J Haematol.* 1999;104:382-391.
- (66) Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood.* 1999;94:3325-3333.
- (67) Moos M, Schulz R, Martin S, Benner A, Haas R. The remission status before and the PCR status after high-dose therapy with peripheral blood stem cell support are prognostic factors for relapse-free survival in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia.* 1998;12:1971-1976.

- (68) Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999;17:268-276.
- (69) Davis TA, White CA, Grillo-Lopez AJ et al. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol.* 1999;17:1851-1857.
- (70) Galimberti S, Guerrini F, Morabito F et al. Quantitative molecular evaluation in autotransplant programs for follicular lymphoma: efficacy of in vivo purging by Rituximab. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:57-63.
- (71) Chang CC, Bredeson C, Juckett M, Logan B, Keever-Taylor CA. Tumor load in patients with follicular lymphoma post stem cell transplantation may correlate with clinical course. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:287-291.
- (72) Ho AY, Devereux S, Mufti GJ, Pagliuca A. Reduced-intensity rituximab-BEAM-CAMPATH allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma is feasible and induces durable molecular remissions. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:551-557.
- (73) Summers KE, Goff LK, Wilson AG et al. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001;19:420-424.
- (74) Ladetto M, Drandi D, Compagno M et al. PCR-detectable nonneoplastic Bcl-2/IgH rearrangements are common in normal subjects and cancer patients at diagnosis but rare in subjects treated with chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2003;21:1398-1403.
- (75) Bentz M, Dohner H, Werner CA et al. Identification of genetic imbalances in malignant lymphoma using comparative genomic hybridization. *Stem Cells.* 1995;13 Suppl 3:83-87.

- (76) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. New York . 1989. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
Ref Type: Report
- (77) Debled M, Hostein I, Astier-Gin T et al. Competitive polymerase chain reaction to quantify tumor cells in peripheral blood of patients with T(14;18)-bearing follicular non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study in 8 patients. *Int J Cancer*. 1999;84:558-561.
- (78) Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol*. 1996;14:1333-1344.
- (79) Leonard BM, Hetu F, Busque L et al. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive polymerase chain reaction: less than one log difference between bone marrow and peripheral blood sources. *Blood*. 1998;91:331-339.
- (80) Meijerink JP, Smetsers TF, Raemaekers JM et al. Quantitation of follicular non-Hodgkin's lymphoma cells carrying t(14;18) by competitive polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 1993;84:250-256.
- (81) Terol MJ, Lopez-Guillermo A, Bosch F et al. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 in non-Hodgkin's lymphoma: relationship with tumor dissemination and prognostic importance. *J Clin Oncol*. 1998;16:35-40.
- (82) Voso MT, Martin S, Hohaus S et al. Prognostic factors for the clinical outcome of patients with follicular lymphoma following high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:957-964.

Eigene Veröffentlichungen:

Martin S, Fischer C, Free M et al. LightCycler-based quantitative real-time PCR monitoring of patients with follicular lymphoma receiving rituximab in combination with conventional or high-dose cytotoxic chemotherapy. *European Journal of Haematology*. 2005;74:282-292.

Martin S, Fischer C, Niederste-Hollenberg A et al. Serial molecular monitoring of residual disease using quantitative real-time PCR in patients with t(14;18) positive follicular lymphoma treated with Rituximab combined with cytotoxic chemotherapy. *Onkologie*. 2003;5.26:P855.

Martin S, Fischer C, Niederste-Hollenberg A et al. Eradication of minimal residual disease in patients with follicular lymphoma depends on the disease status and the type of cytotoxic therapy combined with the anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) as revealed by molecular monitoring with nested and real-time PCR. *Blood*. 2002;100.11:P1395.

Martin S, Fischer C, Niederste-Hollenberg A et al. Molecular monitoring by nested and quantitative real-time PCR in patients with follicular lymphoma undergoing cytotoxic chemotherapy in combination with anti-CD20 MoAb (Rituximab). *Onkologie*. 2002;4.25:P422.

CURRICULUM VITAE

Geburtsdatum	3. Mai 1979
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1985 – 1998	Grundschule und Gymnasium in Leverkusen
Juli 1995 – August 1996	Mullen High School, Denver, USA

Studium

Oktober 1998 – Juni 2005	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
August 2000	Physikum
August 2001	1. Staatsexamen
März 2004	2. Staatsexamen
April 2004 – März 2005	Praktisches Jahr
Mai 2005	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt

Praktisches Jahr

1. Terial, Innere Medizin	Universitätsklinik Virgen de las Nieves, Granada, Spanien
2. Terial, Chirurgie	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
3. Terial, Orthopädie	Orthopädische Universitätsklinik Balgrist, Zürich, Schweiz

Weiterbildung

ab Juli 2005 Assistenzarzt an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Duisburg

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett für die wissenschaftliche und persönliche Betreuung während der Phase der molekularen biologischen Experimente sowie der Auswertung. Dank seiner professionellen Unterstützung konnte ich die Ergebnisse zügig in dieser Arbeit zusammenfassen.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die Möglichkeit an seiner Klinik promovieren zu dürfen. Er war stets am Fortschritt meiner Arbeit interessiert und stellte mir alles notwendige zur Verfügung.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Simona Martin für ihre Kooperation bei der Analyse der Daten und Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Anja Niederste-Hollenberg danke ich, dass sie mir die Arbeit vermittelt hat und mich in die experimentelle molekulare Diagnostik eingewiesen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Math. Slawomir Kliszewski für die statistische Betreuung, Frau Maren Free für die Zusammenarbeit bei den Experimenten sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Hämatologie, Onkologie und klinischer Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die für die Durchführung der Experimente und Auswertung der Daten immer zur Seite standen.

Schließlich danke ich der Leukämie Liga Düsseldorf e.V. sowie Roche Diagnostics und Roche Pharma für die finanzielle Unterstützung des Projekts.