

Aus dem Institut für Humangenetik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. D. Wieczorek

Kombinierte immunomagnetische Zellseparation und
Chromosomenanalyse beim
Multiplen Myelom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Verena Giesen
2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Prof. Dr. med. Harald Rieder

Korreferent: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden als Vortrag auf folgender Tagung vorgestellt

23. Tumorzytogenetische Arbeitstagung (TZA) 2010, Bergisch-Gladbach

Methodenvergleich zur immunomagnetischen Zellseparation und Chromosomenbandenanalyse bei Multiplem Myelom

Giesen, Verena¹

¹Institut für Humangenetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Teile dieser Arbeit wurden als Posterpräsentation auf folgenden Tagungen und Kongressen vorgestellt

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) 2010, Hamburg

V. Giesen, H. Rieder, I. Bachmann, Comparison of column-based and column-free methods for combined immunomagnetic cell separation and chromosome banding analyses in multiple myeloma, Medizinische Genetik,

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11825-010-0212-5> February 2010, Volume 22, Issue 1, pp 63-202

Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2010, Berlin

V. Giesen, H. Rieder, I. Bachmann, Comparison of column-based and column-free methods for combined immunomagnetic cell separation and chromosome banding analyses in multiple myeloma, Onkologie 2010;33(Suppl 6):109–2

Zusammenfassung

Grundlage des Multiplen Myeloms, klassifiziert als B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, ist die maligne Transformation der Plasmazellen.

Durch Zytogenetik kann in einem geringen Anteil der malignen Plasmazellen ein aberranter Klon detektiert werden. FISH erhöht die Rate an gefundenen Aberrationen. Durch Anreicherung der malignen Plasmazellen vor einer molekularzytogenetischen Untersuchung steigt die Rate an gefundenen Aberrationen weiter an. Ein geeignetes Separationsverfahren für die Anreicherung maligner Plasmazellen stellt die immunomagnetische Zellseparation dar.

In Zelllinienversuchen wurden säulenfreie und säulenbasierte immunomagnetische Zellseparationsverfahren hinsichtlich der Ausbeute an Metaphasezellen, der Reinheit und der zytogenetischen Qualität miteinander verglichen.

Die Zelllinienversuche zeigten, dass die Ausbeute an Metaphasezellen von der Wahl der Methode abhängig ist. Die säulenbasierte Methode ist der säulenfreien Methode dabei unterlegen. Hinsichtlich der Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation und der zytogenetischen Qualität ist die säulenbasierte Methode ebenfalls der säulenfreien Methode unterlegen.

Die Ergebnisse immunomagnetischer Zellseparation für eine anschließende Chromosomenbandenanalyse beim Multiplen Myelom lassen sich durch die Wahl der Methoden beeinflussen. Die säulenfreien Methoden scheinen für die immunomagnetische Zellseparation mit anschließender Chromosomenbandenanalyse beim Multiplen Myelom geeignet zu sein.

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CBA	Chromosomenbandenanalyse
CD	Cluster of differentiation
CGH	comparative genomic hybridisation, vergleichende genomische Hybridisierung
cm²	Kubikcentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CRAB	<u>C</u> alcium – <u>r</u> enale Insuffizienz – <u>A</u> nämie – <u>B</u> one Lesion)
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECA	European Cytogenetic Association
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	event free survival
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum, fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
GTG	Giemsa-Trypsin-Chromosomenbandenfärbung
h	Stunden
HCl	Salzsäure
H₂O	Wasser
iFISH	Interphase Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IMWG	International Myeloma Working Group
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ISS	International Staging System
KCl	Kaliumchlorid
KHCO₃	Kaliumhydrogencarbonat
KM	Knochenmark
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
MACS	magnetic activated cell sorting
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
mM	millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPC	Magnetic Particel Concentrator

MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
OS	overall survival
OT	Objekträger
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PET-CT	Positronenemissionstomographie-Computertomographie
pH	Potentia Hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RETI	related end organ tissue
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
R-ISS	revises International Staging System
RT	Raumtemperatur
U	Umdrehungen
upm	Umdrehungen pro Minute
w	with
WB	whole blood
wo	without

Zusammenfassung

Abkürzungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Multiples Myelom	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Diagnostik	3
1.2 Zytogenetik und Molekularzytogenetik des MM	5
1.2.1 Chromosomenaberrationen beim MM	5
1.2.2 Prognostische Bedeutung von genetischen Veränderungen.....	6
1.2.3 Chromosomenaberrationen und Therapie.....	6
1.2.4. Chromosomenaberrationen und Pathogenese.....	7
1.2.5 Nachweis genetischer Aberrationen beim MM mittels Zytogenetik	7
1.2.6 Nachweis genetischer Aberrationen beim MM mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung	8
1.2.7 Verbesserung der Rate an gefunden Aberrationen beim MM durch Anreicherung.....	9
1.3 Zellseparation.....	10
1.3.1 Zellseparation allgemein	10
1.3.2 Immunomagnetische Zellseparation	10
1.3.2.1 Partikel	11
1.3.2.2 Magnet	11
1.3.2.3 Art der Separation	12
1.3.3 Immunomagnetische Zellseparation bei MM	12
1.3.3.1. Material für die immunomagnetische Zellseparation	12
1.3.3.2 Immunphänotyp des MM	13
1.3.3.3 Art der Separation beim MM	14
1.4 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.2 gebrauchsfertige Lösungen und Medien	16
2.1.3 angesetzte Puffer, Lösungen und Medien.....	17
2.1.4 Partikel, Beads, Magneten	17
2.1.5 Geräte	18
2.2. Methoden	18
2.2.1 Zelllinienversuche	18
2.2.1.1 Zelllinien	18

2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien	19
2.2.1.3 Immunomagnetische Zellseparation mit den Zelllinien.....	19
2.2.1.3.1 Ermittlung der Zellzahl.....	19
2.2.1.3.2 Erstellen einer Verdünnungsreihe	19
2.2.1.3.3 Versuchsaufbau	20
2.2.2 Immunomagnetische Zellseparation	20
2.2.2.1 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenfreien Methode 1	20
2.2.2.1.1 Koppeln der Partikel	20
2.2.2.1.2 immunomagnetische Zellseparation mit Methode 1	21
2.2.2.2 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenfreien Methode 2	22
2.2.2.3 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenbasierten Methode 3	23
2.2.3. Chromosomenbandenanalyse	25
2.2.3.1 Chromosomenpräparation.....	25
2.2.3.2 GTG-Bänderung.....	26
2.2.4 Statistische Auswertung der Zelllinienversuche	26
2.2.4.1 Anzahl an Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation ...	26
2.2.4.2 Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation	27
2.2.4.2.1 Analytische Qualität der Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation.....	27
2.2.4.2.2 Vergleich der Reinheit der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode.....	27
2.2.4.2.2.1 Absolute Anzahl an richtig positiven Metaphasen	28
2.2.4.2.2.2 Relative Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren	28
2.2.4.3 Zytogenetische Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation.....	28
2.2.4.3.1 Allgemein	28
3. Ergebnis.....	29
3.1 Ergebnisse der Zelllinienversuche	29
3.1.1 Anzahl an Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation	29
3.1.1.1 Die Ausbeute an Metaphasezellen weicht von der geforderten Anzahl ab	29
3.1.1.2 Zelllinien und Methoden haben Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasezellen.....	30
3.1.1.3 Vergleich der Ausbeute an Metaphasezellen der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode	31
Tabelle 6: Abweichung der Metaphasezellenanzahl von den geforderten 50 Metaphasezellen	32
3.1.2 Reinheit der immunomagentischen Zellseparation	32
3.1.2.1 Analytische Qualität der Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation.....	32
3.1.2.2 Vergleich der Reinheit der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode	34
3.1.2.2.1 Absolute Anzahl an richtig positiven Metaphasen	34
3.1.2.2.2 Relative Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren..	35
3.1.3 Zytogenetische Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation.....	36
3.1.3.1 Zytogenetische Qualität der säulenfreien Methoden im Vergleich mit der säulenbasierten Methode.....	36
4. Diskussion.....	38

4.1 Vergleich der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren mittels Zelllinien	38
4.1.1 Anzahl der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation	38
4.1.1.1 Einfluss der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren auf die Anzahl an Metaphasen	38
4.1.1.2 Vergleich der säulenbasierten und säulenfreien Methoden im Hinblick auf die Anzahl an Metaphasen.....	41
4.1.2 Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation	44
4.1.2.1 Anteil unklarer Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation ...	45
4.1.2.2 Reinheit der CD138+ Fraktion nach immunomagnetischer Zellseparation	46
4.1.3 Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation.....	49
Literaturverzeichnis	53

1. Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems.

Grundlage des MM ist die maligne Transformation der Plasmazellen. Das MM gehört zur Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome.

Mit 10% Anteil an allen hämatologischen Neoplasien ist das MM die zweithäufigste maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Das MM weist in Industriestaaten eine Inzidenz von 4/100000 Einwohner pro Jahr auf. Bei einem medianen Alter von 71 Jahren, findet sich die höchste altersspezifische Inzidenz in der achten Lebensdekade (Goldschmidt und Cremer 2002). Aus der Datenlage der USA geht zudem noch hervor, dass der ethnische Hintergrund die Inzidenz stark beeinflusst. Afroamerikaner weisen eine doppelt so hohe Inzidenz auf. Die Ratio von Männern zu Frauen liegt bei 1,4:1 (Gertz et al. 2004).

Die malignen Plasmazellen infiltrieren diffus das Knochenmark. Dadurch wird die Knochenstruktur zerstört und die Hämatopoese verdrängt. Die Infiltration im Knochenmark führt zu Knochenschmerzen, pathologischen Frakturen oder Osteoporose. Bevorzugte Stellen für das Auftreten von Knochenbeteiligungen sind Wirbelsäule, Rippen, Becken, die langen Röhrenknochen und der Schädel (Goldschmidt und Cremer 2002).

Die Verdrängung der Hämatopoese führt zu Anämien und rezidivierenden Infekten (Lin 2009). Eine erhöhte Blutungsgefahr besteht nur in 5% der Fälle (Kyle et al. 2003). Durch den erhöhten Knochenumbau fallen vermehrt Abbauprodukte an. Dies führt neben Hypercalcämie häufig zu Niereninsuffizienz (Gertz et al. 2004). Zusätzlich produzieren maligne Plasmazellen unkontrolliert einen funktionslosen Idiotyp an Immunglobulinen, welche über die Niere ausgeschieden werden. Dies führt zu einer nephrotoxischen Proteinurie, welche die Niereninsuffizienz verschlimmert.

Wichtig für Therapieentscheidungen und Prognose ist die Klassifizierung des MM.

Durie und Salmon unterteilten das MM in drei Stadien (s. Tab.1). Die Einteilung erfolgte unter Berücksichtigung von Parametern wie Hämoglobin, Serumcalcium, Anzahl der Knochenläsionen und M-Gradient unter Berücksichtigung der Nierenfunktion (Durie und Salmon 1975).

Tabelle 1: Myeloma Staging System (nach Durie und Salmon 1975)

Stadium	Kriterien	Zellmasse an MM-Zellen (Zellen x 10 ¹² /m ²)
I	jedes der folgenden 1. Hämoglobin >10g/dl 2. Serum Calcium normwertig 3. radiologisch unauffällige Knochenstruktur oder Solitäres Plasmozytom 4. geringe M-Gradient Produktionsrate a. IgG <5g/100ml b. IgA <3g/100ml c. Leichtketten M-Gradient in Urin-Elektrophorese <4g/24h	<0.6 (Low)
II	weder Stadium I noch II	0,6 – 1,2 (intermediate)
III	eines oder mehr der folgenden 1. Hämoglobin <8,5 g/dl 2. Serum Calcium >12mg/100ml 3. fortgeschrittene Knochenläsionen 4. hohe M-Gradient Produktionsrate a. IgG >7g/100ml b. IgA >5g/100ml c. Leichtketten M-Gradient in Urin-Elektrophorese >12g/24h	>1,20 (high)
Unterklassifikation		
A = normale Nierenfunktion		
B= verringerte Nierenfunktion		

2005 vereinfachte die International Myeloma Working Group (IMWG) die Klassifizierung des MM. Sie kategorisierte ebenfalls in drei Gruppen, ordnete jedoch nur nach den Parametern Serum β_2 – Mikroglobulin und Serumalbumin

(Greipp et al. 2005). Mit Bekanntwerden weiterer prognostisch relevanter Biomarker wie Laktatdehydrogenase (LDH) und Chromosomenanomalien änderte die IMWG die Klassifizierung 2015 in das *revised International Staging System* (r-ISS) (s. Tab. 2). (Palumbo et al. 2015)

Tabelle 2: Risikofaktoren des MM und das Revised International Staging System

Prognostisch relevanter Biomarker	Kriterium
ISS Stadium	
I	Serum β_2 -Mikroglobulin <3,5 mg/l Serum Albumin \geq 3,5 g/l
II	weder Stadium I noch III
III	Serum β_2 -Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l
Chromosomenanomalie durch Interphase Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (iFISH)	
<i>high risk</i>	Nachweis del(17p) und/oder Translokation t(4;14) und /oder Translokation t(14;16)
<i>standard risk</i>	Keine <i>high risk</i> Chromosomanomalien
LDH	
Normal	Serum LDH < oberes Normwertlimit
Hoch	Serum LDH > oberes Normwertlimit
R-ISS Stadium	
I	ISS Stadium I und <i>standard risk</i> Chromosomenanomalien und normale LDH
II	Weder Stadium I noch III
III	ISS Stadium 3 und entweder <i>high risk</i> Chromosomenanomalien oder erhöhte LDH

1.1.2 Diagnostik

Die Diagnostik beim MM unterteilt nach den Kriterien der International Myeloma Working Group in die Untergruppen *Smouldering Myelom* und *Multiples Myelom* (s.Tab.3).

Tabelle 3: Diagnostische Kriterien für MM und *Smouldering Myelom* nach den IMWG Kriterien

Multipl. Myelom	<i>smouldering Myelom</i>
Klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq 10\%$ oder durch Biopsie bestätigtes knöchernes oder extramedulläres Plasmozytom	Auftreten beider folgender Kriterien <ul style="list-style-type: none"> - Monoklonales Protein im Serum (IgA oder IgG) ≥ 30 g/l <u>oder</u> Monoklonales Protein im 24-h Sammelurin ≥ 500 mg <u>oder</u> klonale Plasmazellen im Knochenmark 10-60% - Keine Myelom definierende Ereignisse oder Amyloidose
Myelom definierendes Ereignis <ul style="list-style-type: none"> - RETI - klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq 60\%$ - Verhältnis von beteiligten/unbeteiligten freien Leichtketten ≥ 100 - > 1 fokale Läsion im MRT 	

Unterscheidungsparameter sind der Anteil klonaler Plasmazellen im Knochenmark, der monoklonale Proteingehalt im Serum und Urin und das Vorhandensein eines Myelom definierenden Ereignisses. Zur Bestimmung eines Myelom definierenden Ereignisses benötigt man die Bestimmung der freien Leichtketten, eine Magnetresonanztomographie (MRT), sowie das Vorhandensein eines Endorganschadens (*RETI – related end organ tissue*). (Rajkumar et al. 2014) Das Ausmaß eines Endorganschadens wird über die CRAB-Kriterien (Calcium-Renale Insuffizienz-Anämie- Knochenläsionen (*Bone lesions*), s. Tab.4) definiert (International Myeloma Working Group 2003; Schroers et al. 2005, San Miguel et al. 2006;).

Tabelle 4: Endorganschaden nach den CRAB-Kriterien

Calcium	Serum Calcium > 0,25 mmol/l über dem normalen Limit oder >2,75 mmol/l
Renale Insuffizienz	Kreatinin >177 µmol/l oder Kreatininclearance <40 ml/min
Anämie	Hb > 2g/dl unter dem untersten Limit oder <10g/dl
Bone lesions	osteolytische Läsionen nachgewiesen durch Röntgen, Computertomographie (CT) oder Positronenemissionstomographie- Computertomographie (PET-CT)

Dies bedeutet, dass an minimaler Diagnostik für das MM eine Blutanalyse auf die Parameter Hämoglobin, Calcium, Kreatinin, eine Eiweißelektrophorese von Serum und Urin, die Bestimmung der freien Leichtketten, eine Knochenmarkbiopsie mit Bestimmung des Anteils klonaler Plasmazellen, sowie eine radiologische Diagnostik ausreichend ist.

Weitere Analysen wie quantitative Immunglobulinbestimmung, Immunfixationselektrophorese, immunzytologische Analysen des Knochenmarks oder auch molekularzytogenetische Analysen geben eher prognostische, als diagnostische Aussagen (Munshi 2008).

1.2 Zytogenetik und Molekularzytogenetik des MM

1.2.1 Chromosomenaberrationen beim MM

Nach der International Myeloma Working Group können chromosomale Aberrationen beim MM in zwei Kategorien sowie "secondary events" unterteilt werden.

Der erste, hyperdiploide Typ weist Chromosomensätze >46 Chromosomen mit Trisomien vor allem der ungeradzahligen Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 auf.

Der zweite, hypodiploide Typ zeichnet sich durch weniger als 46 Chromosomen oder 46 Chromosomen mit strukturellen Veränderungen (Pseudodiploidie) aus. In dieser Kategorie treten signifikant häufiger folgende 14q32 Translokationen auf: t(11;14)(q13;q32); t(4;14)(p16;q32); t(14;16)(q32;q23) (Fonseca et al. 2009).

Eine weitere chromosomale Aberration ohne Einteilung in eine bestimmte Kategorie ist die Monosomie 13 oder del(13)(q). Sie ist in ca. 50% der Fälle auffindbar (Chen et al. 2007; Fonseca et al. 2009).

Weitere häufige Aberrationen treten als sogenannte "secondary events" im Verlauf der Erkrankung auf. 10-15% der Fälle weisen eine del(17)(p13) auf (Avet-Loiseau 2007; Mohamed et al. 2007). Außerdem können Verluste oder Zugewinne an Chromosom 1, sowie C-MYC-Translokationen vorhanden sein. Weitere genetische Veränderungen betreffen die Aktivierung des NF-κB Signalweg, RAS, 12p- oder 16p-Aberrationen.

1.2.2 Prognostische Bedeutung von genetischen Veränderungen

Chromosomale Aberrationen beim MM lassen verschiedene Aussagen zu.

Zum einen haben bestimmte chromosomale Aberrationen eine Bedeutung für die Prognose hinsichtlich des *event-free survival* (EFS) oder *overall survival* (OS). Eine del(17)(p) ist der wichtigste Prognosefaktor für eine Verkürzung des EFS und ist mit einem schlechtem OS assoziiert (Fonseca et al. 2009). Ein weiterer ungünstiger Prognosefaktor ist t(4;14). Del(13)(q) oder Veränderungen an Chromosom 1 wurden lange als Prognosefaktoren diskutiert. Es scheint, dass diese nur in Kombination mit weiteren Parametern prognostische Relevanz haben (Avet-Loiseau 2007; Avet-Loiseau et al. 2007).

Findet man in molekular- oder zytogenetischen Untersuchungen die oben genannten Aberrationen, muss man mit einem aggressiven Krankheitsverlauf rechnen.

1.2.3 Chromosomenaberrationen und Therapie

Mit Einführung der *novel agents* besteht die Möglichkeit molekular- und zytogenetischen Diagnosen mit schlechter Prognose entgegenzuwirken.

So konnte in Studien belegt werden, dass sich das OS oder EFS von Patienten mit den prognostisch ungünstigen t(4;14) oder del(13q) bei Behandlung mit Bortezomib als Beispiel eines Proteasomen Inhibitors signifikant verbesserte (Jagannath et al. 2007; Avet-Loiseau et al. 2010).

Lenalidomid als Beispiel für einen Immunmodulator verbesserte das EFS von Patienten mit del(17p). Bei Patienten mit t(4;14) hatte Lenalidomid keinen signifikanten Einfluss auf das EFS. (Usmani et al. 2015)

Weitere Therapieansätze durch *novel agents* wie monoklonale Antikörper, Deacetylase Inhibitoren oder auf den Zellzyklus einwirkende Medikamente müssen

erst noch hinsichtlich ihres Einflusses auf das OS oder EFS bei molekular- oder zytogenetischen Diagnosen getestet werden.(Ocio et al. 2014)

Patienten profitieren in Zukunft von molekular- und zytogenetischen Diagnosen durch Verbesserung von OS und EFS durch spezifisch auf Aberrationen abgestimmte Therapien.

1.2.4. Chromosomenaberrationen und Pathogenese

Außerdem lassen chromosomale Aberrationen Rückschlüsse auf die Pathogenese zu. Ein besseres Verständnis der Pathogenese ermöglicht neue Ansätze in der Entwicklung von Therapien. So führen beispielsweise IGH-Translokationen zur Dysregulation ihrer Genprodukte. Ist der Translokationspartner 4p16 betroffen, wird die Rezeptortyrosinkinase FGFR3 aktiviert. Ist der Chromosomenabschnitt 16q23 betroffen, wird der Transkriptionsfaktor MAF aktiviert. Beides stimuliert die Zellproliferation und die Adhäsion der MM-Zelle im Knochenmark. Dieser Zusammenhang macht FGFR 3 zu einem therapeutischem Ziel für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten (Bergsagel und Kuehl 2005; Hideshima et al. 2007).

Molekulargenetisch bekannte Aberrationen können aber auch Grundlage für weitere Forschung sein. So führten Chapman et al *whole-exome sequencing* bei MM mit bekannten aberranten Chromosomen durch. Neben der Bestätigung von Mutationen in bekannten Signalwegen der Pathogenese wie NF-κB, fanden sich neue Mutationen, wie die der onkogenen Kinase BRAF. Durch diese Entdeckung kommt nun ein BRAF Inhibitor für die Therapie beim MM in Frage (Chapman et al. 2011).

Das Wissen um chromosomale Aberrationen beim MM ist somit wichtig für Patient und Arzt. Zum einen erlauben chromosomale Aberrationen eine konkrete Prognose und führen zu verbesserten Therapien. Zum anderen sind sie für die weitere Entwicklung von Therapien wichtig. Molekular- und zytogenetische Untersuchungen sind daher bei jedem Patienten unerlässlich.

1.2.5 Nachweis genetischer Aberrationen beim MM mittels Zytogenetik

1968 gelang es Caspersson et al., Chromosomenbanden mit Färbemitteln wie Quinacrine oder Giemsa sichtbar zu machen. Dies ermöglichte es, die 23 Chromosomen voneinander zu unterscheiden, mögliche Fehler im Bandenmuster zu erkennen und diese als Aberrationen zu diagnostizieren.

In einer der ersten größeren zytogenetischen MM-Studien mit einem Patientenkollektiv von 100 Patienten wiesen Dewald et al. in 27% einen aberranten Klon nach. In weiteren Studien lag die Rate an gefundenen aberranten Klonen zwischen 15% -49% (Sawyer et al. 1995; Weh et al. 1993; Nilsson et al. 2004; Wiktor und van Dyke 2004; Dewald et al. 2005; Ortega et al. 2016). Dieser niedrige Anteil aberranter Klone liegt an der geringen proliferativen Aktivität der Plasmazellen. Andere hämatopoietische Zellen des untersuchten Materials weisen eine höhere proliferative Aktivität auf. Daher stammen die untersuchten Metaphasen häufig nicht von Plasmazellen, sondern von anderen hämatopoietischen Zellen ab (Weh et al. 1993; Pratt 2002).

Diskutiert wird ein Zusammenhang zwischen Stadium des Patienten und dem Anteil aberranter Klone. Sawyer et al und weitere konnten zeigen, dass die Nachweisbarkeit aberranter Klone mit höherem Stadium positiv korreliert (Dewald et al. 1985; Weh et al. 1993; Sawyer et al. 1995). Nilsson et al konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Nilsson et al. 2002).

Trotz des niedrigen Anteils aberranter Klone und des eher späten Auftretens mit höheren Stadien, fordert die IMWG die zytogenetische Untersuchung aller Patienten bei Diagnosestellung, da sie wichtige prognostische Hinweise gibt (Fonseca et al. 2009).

1.2.6 Nachweis genetischer Aberrationen beim MM mittels

Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung

Mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) lässt sich die Rate an gefundenen Aberrationen verbessern.

Die seit 1981 angewandte Technologie erlaubt es spezifische DNA-Sequenzen auf Chromosomen mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Dabei kann FISH sowohl an Metaphase-, als auch an Interphasekernen durchgeführt werden. Damit werden FISH-Analysen nicht von der geringen proliferativen Aktivität der MM-Zellen beeinflusst. Die Analyse der markierten Sequenzen erlaubt genauere

Aussagen zu Bruchpunkten oder Translokationsstellen als die Zytogenetik. Dadurch erweitert sich das Spektrum der möglichen auffindbaren Aberrationen.

Wiktor et al konnten in ihrer Studie zeigen, dass FISH-Analysen in 29% chromosomale Aberrationen aufwiesen. Die ebenfalls durchgeführte Zytogenetik derselben Proben wies nur in 15% der Fälle chromosomale Aberrationen auf. Mit FISH konnten somit mehr chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. In vergleichbaren Studien konnten Kaufmann et al mit FISH die Detektion von del(13q) um 22% verbessern (Kaufmann et al. 2003). Dewald et al konnten ihre Detektionsrate durch die Anwendung von Metaphase-FISH um 2% verbessern (Dewald et al. 2005).

Mit FISH lässt sich auch das Spektrum an auffindbaren Aberrationen erweitern. Beispielsweise ist die prognostisch ungünstige kryptische Translokation t(4;14)(p16;q32) nur mittels FISH nachweisbar (Fonseca et al. 2009).

Die IMWG fordert als minimales FISH Panel t(4;14), t(14;16) und del(17)(p13), welches um die Amplifikation (1)(q) und die del(1)(p) ergänzt werden kann (Fonseca et al. 2009).

Allerdings kann FISH die Zytogenetik nicht ersetzen (Dewald et al. 2005). Optimal wäre die sich ergänzende Anwendung beider Verfahren.

1.2.7 Verbesserung der Rate an gefundenen Aberrationen beim MM durch Anreicherung

Die Detektionsrate von chromosomalen Aberrationen der MM-Zellen lässt sich durch Anwendung von Separationsverfahren verbessern.

Separationsverfahren beim MM isolieren Plasmazellen aus ihrem Zellverband. Nachfolgende Untersuchungen finden nur mit den isolierten Plasmazellen statt und werden nicht durch andere hämatopoetische Zellen beeinflusst.

Durch Separation von Plasmazellen konnten die Detektionsraten von chromosomalen Aberrationen beim MM in FISH Analysen auf 83,3% - 90% (Avet-Loiseau et al. 2007; Chen et al. 2007) verbessert werden. Array-CGH Analysen zeigten nach Separation der Plasmazellen in 100% Copy number variations (Largo et al. 2007).

Chen et al konnten im direkten Vergleich nachweisen, dass sich die Detektionsrate in FISH Analysen mit immunomagnetischer Separation um 48%

auf 72% detektierbare chromosomale Aberrationen verbessern lässt (Chen et al. 2005).

Die IMWG fordert seit 2009 für jeden MM-Fall mindestens eine molekularzytogenetische Analyse an separierten Plasmazellen (Fonseca et al. 2009).

Eine molekulargenetische Analyse an MM-Zellen muss nach vorheriger Separation der Plasmazellen stattfinden.

1.3 Zellseparation

1.3.1 Zellseparation allgemein

Separationsverfahren dienen der Isolierung eines gesuchten Stoffes aus einer Mischung.

Die ältesten und in der Handhabung einfachsten Verfahren trennen dabei Stoffe hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften auf. Die Zentrifugation nutzt dabei die unterschiedliche Dichte, die Filtration die Größenunterschiede einzelner Bestandteile.

Da diese Verfahren aber keine Isolierung kleinerer Zellpopulationen erlauben, sondern größere Fraktionen voneinander trennen, machen sich neue Methoden die Affinität oder immunologischen Eigenschaften der Oberflächenmoleküle der gesuchten Populationen zunutze.

Die Gemeinsamkeit aller affinitätsbasierten Separationsverfahren besteht in der Verwendung von Antikörpern, die gegen auf der Zelloberfläche exprimierte Antigene gerichtet sind. Die gesuchte Zellpopulation kann über diesen Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FACS), einem magnetischen Partikel (MACS) oder einer Matrix (Chromatographie) verbunden werden. Anschließend werden alle nicht markierten oder gebundenen Zellen abgetrennt. Übrig bleibt die gesuchte Zellpopulation. Der Erfolg des jeweiligen Verfahrens wird durch die Reinheit der Zielzellen und die Ausbeute charakterisiert.

1.3.2 Immunomagnetische Zellseparation

Das Separationsverfahren der immunomagnetischen Zellseparation benötigt für die Separation einer definierten Zellpopulation aus einer Suspension ein

magnetisches Feld und einen mit einem Antikörper verbundenen ferromagnetischen Partikel.

1.3.2.1 Partikel

Der immunomagnetischen Partikel besteht aus einem Kern aus Ferritin oder Magnetoferritin. Dieser hat superparamagnetische Eigenschaften. Das bedeutet, dass kleine Partikel bis 10nm vorliegen, die in Lösung bleiben. Außerhalb eines magnetischen Feldes weisen superparamagnetische Partikel keine magnetischen Eigenschaften auf. Je nach Hersteller variiert die Größe des superparamagnetischen Partikels von 4,5µm bis 50nm. Dies hat Einfluss auf das benötigte magnetische Feld. Je kleiner der Partikel wird, desto stärker muss der Gradient des magnetischen Feldes sein, um die magnetischen Eigenschaften des Partikels zu aktivieren.

Die Hülle der ferromagnetischen Partikel besteht aus Dextran oder Polystyren. So wird der reaktionsfreudige Kern von direktem Kontakt zur Zellpopulation abgehalten. Die Dextran- oder Polystyrenmatrix hat laut Hersteller keinen Einfluss auf Struktur, Funktion oder Aktivität der in der Zellpopulation enthaltenen Zellen. Auf der Hülle sind die gegen die Oberflächenmoleküle der gesuchten Zellpopulation gerichteten Antikörper befestigt (Zborowski 2008).

Zusammengefasst liegen immunomagnetische Partikel gelöst vor, weisen erst magnetische Eigenschaften auf, wenn sie in ein der Größe ihres Partikels entsprechendes magnetisches Feld gelangen, interagieren nicht mit anderen Bestandteilen der Suspension und können über spezifische Antikörper gezielt an gesuchte Zellpopulationen binden.

1.3.2.2 Magnet

Der Magnet, der das magnetische Feld und somit den Gradienten für die immunomagnetische Zellseparation erzeugt, ist charakteristisch für jeden Hersteller.

Ein von außen an ein Reaktionsgefäß angebrachter Magnet erzeugt ein schwaches magnetisches Feld mit offenem Gradienten. Dieses Prinzip ist für große immunomagnetische Partikel ausreichend.

Durchläuft eine Suspension magnetisch aufgeladene Säulen erzeugen diese ein starkes magnetisches Feld mit einem starken magnetischen Gradienten. Dies wäre für kleine immunomagnetische Partikel von Vorteil.

Quadrupolmagneten erzeugen offene Gradienten mit starken magnetischen Feldern. Sie sind daher auch für kleine immunomagnetische Partikel geeignet.

Jeder Hersteller hat somit Magneten konstruiert, die auf die Größe seiner immunomagentischen Partikel abgestimmt sind (Kumar 2007; Zborowski 2008).

1.3.2.3 Art der Separation

Um eine gesuchte Zellpopulation aus einer Suspension mittels immunomagnetischer Zellseparation zu isolieren, stehen zwei Verfahren zur Verfügung: positive Selektion und negative Selektion.

Bei der positiven Selektion binden die immunomagnetischen Partikel an Oberflächenmoleküle der gesuchten Zellpopulation. Die gesuchte Zellpopulation bleibt im magnetischen Feld haften. Die nicht gesuchten Zellpopulationen werden entfernt. Dieses Verfahren bietet bessere Reinheit, gerade bei geringer Zellzahl der gesuchten Zellpopulation in der Ausgangssuspension.

Bei der negativen Selektion werden bis auf die gesuchte Zellpopulation alle Zellen der Population an immunomagnetische Partikel gebunden. Die nicht gesuchten Zellen bleiben im magnetischen Feld haften. Die gesuchte Zellpopulation kann gesammelt werden. Dieses Verfahren bietet sich an, wenn kein spezifischer Oberflächenmarker für die gesuchte Zellpopulation vorhanden ist.

Beide Verfahren können auch nacheinander angewandt werden. Es gilt jedoch zu bedenken, dass jede Separation auch Zellschaden oder -verlust beinhaltet. Daher sollten das Verfahren mit der geringsten Anzahl an Separationsschritten gewählt werden (Kumar 2007; Zborowski 2008).

Je nach spezifischen Oberflächenmarker, Anteil der gesuchten Zellen in der Population, Anzahl der Separationsschritte oder gewünschter Reinheit, muss man sich für eine Strategie entscheiden.

1.3.3 Immunomagnetische Zellseparation bei MM

1.3.3.1. Material für die immunomagnetische Zellseparation

MM-Zellen lassen sich in Knochenmarksaspiraten oder in seltenen Fällen im Blut nachweisen.

Wie alle Plasmazellen wandern maligne transformierte MM-Zellen nach ihrer Reifung von einer B-Zelle zur Plasmazelle ins Knochenmark. Durch zahlreiche Interaktion mit den Zellen des Knochenmarks und der Extrazellulärmatrix, vermittelt über Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone etc, breiten sich die MM-Zellen im Knochenmark aus (Bergsagel und Kuehl 2005; Jagannath 2008).

Wenige Zellen verlassen das KM und zirkulieren im Blut (Billadeau et al. 1992). Daher lassen sich MM-Zellen in geringen Mengen auch im Blut nachweisen.

Für immunomagnetische Zellseparation eignet sich somit Knochenmarksaspirat am besten, um MM-Zellen zu separieren.

1.3.3.2 Immunphänotyp des MM

Der Immunphänotyp der MM-Zellen entscheidet über die Wahl des richtigen Oberflächenmarkers.

Der bekannteste Marker, den normale und maligne Plasmazellen exprimieren ist CD138 oder Syndecan-1. CD138 ist ein Heparan Sulfat, dass über Bindung von Wachstumsfaktoren, Proteasen, Zellmatrix oder Zell-Zell-Adhäsionen an der Regulation von Zellwachstum, Überleben, Differenzierung, Adhäsion oder Migration beteiligt ist (Sanderson und Børset 2002).

CD38 ist ein weiterer Marker, der von Plasmazellen exprimiert wird. Maligne Plasmazellen können ihn schwächer exprimieren als normale Plasmazellen (Bataille et al. 2006; Kumar et al. 2010). Daher eignet sich CD38 nicht als Oberflächenmarker für die immunomagnetische Zellseparation. Um die maligne Plasmazelle von der normalen Plasmazelle zu unterscheiden muss die Expression weiterer Oberflächenmarker durchgeführt werden. Die maligne Plasmazelle charakterisiert eine vermehrte Expression von CD56, CD33 und CD28 oder die verminderte Expression von CD19 und CD27 (Kumar et al. 2010). In der immunomagnetischen Zellseparation kann aber nur ein Marker verwendet werden. Keiner der soeben genannten Oberflächenmarker charakterisiert alleine zuverlässig die maligne Plasmazelle.

Nur mit CD138 kann die Zellpopulation der normalen und malignen Plasmazellen aus Knochenmarksaspirat separiert werden. Da der Anteil normaler Plasmazellen

bei einem MM sehr gering ist, ist ihr Vorkommen in der separierten Fraktion nicht störend.

Somit ist eine Anreicherung maligner Plasmazellen durch immunomagnetische Zellseparation mit einem gegen CD138 gerichteten Antikörper möglich.

1.3.3.3 Art der Separation beim MM

Da ein geeigneter Oberflächenmarker vorhanden und die Zellpopulation der Plasmazellen meistens sehr niedrig ist, eignet sich als immunomagnetisches Verfahren die positive Selektion.

Nach der immunomagnetischen Zellseparation erhält man eine Fraktion an CD138 positiven Plasmazellen. Diese sind in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt. Die CD138 positiven Plasmazellen stehen dann für weitere Analysen wie molekularzytogenetische Untersuchungen zur Verfügung.

1.4 Fragestellung

Die Arbeitsgruppe um Prof. H. Rieder hat die kombinierte immunomagnetische Zellseparation mit anschließender Chromosomenpräparation und –analyse zuvor angewandt. CD19+ und CD7+ ALL-Zellen wurden erfolgreich separiert und molekularzytogenetisch untersucht. Es stellt sich nun die Frage ob dieses Verfahren ebenfalls erfolgreich beim Multiplen Myelom angewendet werden kann (Rieder et al. 2003).

Die Fragestellung lässt sich aber nicht gänzlich auf das Multiple Myelom übertragen.

In der o.g. Studie wurde ein immunomagnetisches Verfahren der Firma Dynal verwendet. Dieses kennzeichnet sich durch immunomagnetische Partikel mit 4,5µm Durchmesser. Das Protokoll dieses Verfahrens sieht vor, dass die immunomagnetischen Partikel aus der positiven Fraktion entfernt werden. Dies gelingt nicht gänzlich. So bleiben Partikel in der positiven Fraktion zurück und stören aufgrund ihrer Größe nachfolgende Analyseverfahren.

Bei der Chromosomenbandenanalyse ist die Beeinträchtigung durch die Partikel nicht groß. FISH Analysen werden allerdings erheblich gestört.

Da die molekularzytogenetischen Analysen beim MM auf FISH-Analysen beruhen, eignet sich das Verfahren der Firma Dynal somit weniger für die immunomagnetische Zellseparation beim MM.

Es stellt sich die Frage, ob das bekannte Verfahren der Firma Dynal durch ein anderes Verfahren ersetzt werden kann, welches keinen Einfluss auf FISH hat.

Im Bereich der immunomagnetischen Zellseparation gibt es weitere Methoden zur immunomagnetischen Zellseparation.

Die Firma StemCell entwickelte eine aus Nanopartikel bestehende Methode. Die Separation findet automatisiert im magnetischen Feld eines Quadrupol Magneten statt.

Eine zweite Methode wurde von der Firma Milteny entwickelt. Die Separation findet im magnetischen Feld einer magnetischen Säulenmatrix statt.

In dieser Arbeit wurden die drei Methoden anhand von Zelllinienversuchen miteinander verglichen.

Der Fokus lag dabei auf Ausbeute, Reinheit und Qualität der immunomagnetischen Zellseparation bei MM-Zellen.

Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Vergleich der säulenbasierten Methode mit den säulenfreien Methoden gelegt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Ammoniumchlorid	Merck
Aqua dest.	DeltaSelect
Ethanol absolute, p.a.	Merck
Cellstar [®] , 12ml cell culture tube, steril	Greiner Bio One
Cellstar [®] 15ml, PP test tube, steril	Greiner Bio One
Cell Strainer 100µm, Nylon	BD/ Falcon [®]
Deckgläser 18 x 18 mm; 22 x 22 mm; 24 x 60 mm	Menzel Gläser [®]

EDTA	Sigma® Aldrich
Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei, p.a.	Merck
Falcon 50ml, conical tube	Falcon /Becton Dickinson
Fixogum	Marabu
Fuchs-Rosenthal-Kammer	
Kaliumchlorid p.a.	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Sigma® Aldrich
Objektträger Superfrost® (ISO Norm 8037/l)	Menzel-Gläser
Parafilm	Pechiney Packing
14ml Polystyrene round bottom tube	BD/Falcon®
Safe Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml	Eppendorf AG
Trinatriumcitratdihydrat	Sigma® Aldrich
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories
Zellkulturflaschen aus PS, 25 cm ² ; 75 cm ² ; 150cm ²	Nunc™
Zellkulturflaschen 150 cm ²	TPP®

2.1.2 gebrauchsfertige Lösungen und Medien

Antibiotic-Antimycotic (Penicillin G 10.000 Units/ml, Streptomycin 10000 µg/ml, AmphotericinB 25 µg/ml)	GibCo®
autoMACS Running Buffer – MACS Separation Buffer w PBS, BSA, EDTA, 0,09% Azide	Milteny Biotec
CertiPUR®-Pufferlösung pH 6,88	Merck
DNase I 100mg	Roche
Fetal Bovine Serum	Pan™ Biotech
Giemsa	Merck

KaryoMAX® Colcemid® Solution, liquid (10 µg/ml), in PBS	GibCo®
lyophilisiertes Trypsin Puder 1:250	Pan™ Biotech
Natriumchlorid	Merck
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom AG
Robosep Buffer w D-PBS, FBS, EDTA	StemCell Technologies
RPMI 1640 w L-Glutamin, w Phenolrot	Pan™ Biotech
RPMI 1640 w L-Glutamin, wo Phenolrot	Pan™ Biotech

2.1.3 angesetzte Puffer, Lösungen und Medien

Erythrozyten-Lyse_Puffer pH 7,4	1L H ₂ O, 8,02 g NH ₄ Cl, 1g KHCO ₃ , 0,04 g EDTA
Essigsäure 10%	9ml Aqua dest/1ml Essigsäure
Ethanol	30%, 50%, 70%, 100%
Ethanol-Essigsäure (Fixativ)	3 Teile Ethanol/1 Teil Essigsäure
Dynal-Puffer	RPMI 1640 w L-Glutamin, wo Phenolrot/ 1%FBS
Giemsa Lösung	8 ml Giemsa/ 80 ml CertiPUR®- Pufferlösung
KCl-Lösung 0,075 M	5,6g KCl ad 1l Aqua dest.
Robosep-Puffer	98% PBS Dulbecco/2% FBS/ 1mM EDTA
Trypsin-Lösung	10 mg Trypsin/10ml CertiPUR®- Pufferlösung
Zellkultur-Medium	RPMI 1640 w L-Glutamin, w Phenolrot /1% FBS/ Antibiotic-Antimycotic

2.1.4 Partikel, Beads, Magneten

CD138 MicroBeads human	Milteny Biotech
CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit	invitrogen
Dynabeads® MPC®-1 (Magnetic Particle	Dynal

Concentrator)

EasySep® Human Whole Blood CD138 positive Selection Cocktail	StemCell Technologies
EasySep® Whole Blood Magnetic Particles	StemCell Technologies
MPC™-L Magnet	Dynal
MACS® MultiStand	Milteny Biotech
MACS Separation Columns, LS Column	Milteny Biotech
MACS Separation Column MS	Milteny Biotech
OctoMACS™ Separation Unit	Milteny Biotech
Purified Mouse AntiHuman CD138	BD Pharmingen
Robosep® The Fully Automated Cell Separator	StemCell Technologies
Robosep Tip Racks	StemCell Technologies
"The Big Easy" EasySep® Magnet	StemCell Technologies

2.1.5 Geräte

Dosierpumpe	Watson Marlow 505Di
Mikroskop – Axioscope A1	Zeiss
Mikroskop – Axioskop 40	Zeiss
Software	Metasystems Ikaros Karyotyping System V 5.2.15
Taumelrollmischer	TRM V, IDL
Vortexer	Heidolph REAX 2000 Vortexer
Wasserbad	Julabo Exatherm V3 electronic Wasserbad
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge	Hettich Rotina 46 R; Rotor 4624

2.2. Methoden

2.2.1 Zelllinienversuche

2.2.1.1 Zelllinien

Die Versuchsreihe wurde mit den drei MM-Zelllinien U266, OPM-2 und RPMI-8226 und der CML-Zelllinie K562 durchgeführt.

Die Zelllinien stammten aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Das wichtigste Auswahlkriterium für die MM-Zelllinien war der positive CD138 Status. Darüber hinaus sollten die Zelllinien annähernd gleiche Verdopplungszeiten aufweisen, um den zeitlichen Ablauf der Versuche konstant halten zu können. Die MM-Zelllinien U266, OPM-2 und RPMI-8226 erfüllten diese Kriterien.

Die CML-Zelllinie K562 wählte ich als Kontaminationszelllinie aus.

2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Um die vier Zelllinien K562, U266, OPM-2 und RPMI-8226 verwenden zu können, mussten sie für die Dauer der Versuche in Kultur gehalten werden.

Dafür wurden sie bei 37 °C und 5 % CO₂ in 150 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium für die 40 ml Suspension verwendete ich RPMI 1640 + 10 % FCS und einem Antibiotikum/Antimykotikum. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Der vorher aufgeschüttelten Suspension wurden, je nach Farbumschlag und Zustand der Zellen unter dem Mikroskop, 10-30 ml Suspension entnommen. Die entnommene Menge wurde mit Nährmedium aufgefüllt.

2.2.1.3 Immunomagnetische Zellseparation mit den Zelllinien

2.2.1.3.1 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl ermittelte ich mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer.

Dazu wurde der Suspension 0,1 ml entnommen und in ein mit 0,3 ml 10% Essigsäure gefülltes Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Das Gemisch wurde auf die Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben und vier Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl pro 5 ml ergab sich dann aus der Summe der vier ausgezählten Quadranten multipliziert mit 2500.

Um die geforderte Zellzahl von 2 Mio/ml zu erhalten, musste ich die ermittelte Zellzahl der Suspension durch Verdünnen mit Medium reduzieren.

2.2.1.3.2 Erstellen einer Verdünnungsreihe

Die vier Reaktionssuspensionen der Verdünnungsreihe zu 5 ml setzte ich wie folgt an: 1. 50 % (2,5 ml MM-Zelllinie; 2,5 ml K562), 2. 25 % (1,25 ml Zielzelllinie; 3,75 ml K562), 3. 5 % (0,25 ml MM-Zelllinie; 4,75 ml K562), 4. 0 % (5 ml K562).

2.2.1.3.3 Versuchsaufbau

Pro Zielzelllinie wurden drei Versuche pro Methode durchgeführt.

2.2.2 Immunomagnetische Zellseparation

2.2.2.1 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenfreien Methode 1

2.2.2.1.1 Koppeln der Partikel

Für die immunomagnetische Zellseparation mit der säulenfreien Methode 1 benötigt man Partikel die spezifisch das CD138-Antigen der Zielzelllinien erkennen und an dieses binden. Durch die gleichzeitige magnetische Eigenschaft des Partikels soll dieser mit der gebundenen Zielzelllinie im magnetischen Feld haften bleiben und so die Zielzelllinie immunomagnetisch separieren.

Den magnetischen Anteil des Partikels bilden die CELLection™ Pan Mouse IgG Dynabeads. Der Dynabead ist 4,5 µm groß und besitzt superparamagnetische Eigenschaften. Über einen DNA-Linker ist er mit monoklonalen IgG Antikörpern verbunden. Die drei Komponenten Dynabead, DNA-Linker und IgG Antikörper bilden den immunomagnetischen Partikel.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden 500 µl der CELLection™ Pan Mouse IgG Dynabeads in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde an einen Magneten (MPC™-L Magnet) gestellt. Durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Dynal-Puffer wurden nicht über den DNA-Linker mit dem Dynabead verbundene monoklonale IgG Antikörper aus der Suspension entfernt. Im Anschluss wurden die Partikel in 100 µl Dynal-Puffer aufgenommen.

Die immunologische Komponente in dieser Versuchsreihe bildete ein IgG Antikörper (Purified Mouse Anti-human CD138), der das CD138-Antigen der Zielzellen erkennt und bindet. Der 100 µl Suspension der gewaschenen Partikel wurden 50 µl (1 µg/10⁷ Beads) des Anti-human CD138 IgG Antikörpers hinzugefügt. Während der 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollmischer koppelten die IgG-Antikörper der CELLection™ Pan Mouse IgG

Dynabeads an IgG Antikörper des Anti-human CD138. Danach stellte ich die Suspension mit Dynal-Puffer auf das Volumen der entnommenen Partikel (500 µl) ein.

So entstanden spezifische immunomagnetische Partikel, die CD138+ MM-Zellen erkennen, binden und separieren können.

2.2.2.1.2 immunomagnetische Zellseparation mit Methode 1

Die Separation der Zielzellen anhand ihres Oberflächenantigens CD138 findet bei Methode 1 in vier Teilschritten statt und läuft im schwachen magnetischen Feld, des von außen angebrachten Magneten, ab.

Für den ersten Teilschritt, der Inkubation von immunomagnetischen Partikeln und Zellsuspension, musste die Zellsuspension auf 4 °C abgekühlt werden. Es wurden 50 µl des Partikels in die mit Colcemid vorbehandelte 5 ml Zellsuspension gegeben. Während der 30 minütigen Inkubation bei 4 °C auf dem Taumelrollmischer sollte eine hohe Dichte an Bindungen zwischen den Partikeln und dem CD138-Antigen der Zielzellen erreicht werden.

Im zweiten Teilschritt wurden die Zellen entfernt, die nicht an Partikel gebunden hatten (negative Fraktion). Das Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension wurde an einen Magneten (Dynal MCP®-L Magnet) gestellt. Die immunomagnetisch markierten Zellen wanderten nun in Richtung des von außen angebrachten Magneten und sammelten sich an der Wand des Reaktionsgefäßes. Der Überstand mit CD138-negativen Zellen konnte dann abpipettiert werden. Das Reaktionsgefäß wurde aus der Halterung des Magneten genommen und 1 ml Dynal-Puffer hinzugegeben. Die Separation wurde zur Verbesserung der Reinheit und Ausbeute zweimal wiederholt. Damit die immunomagnetisch markierten Zellen anschließend nicht austrockneten, wurden 5 ml auf 37 °C erwärmtes RPMI in das Reaktionsgefäß gegeben. Übrig blieben CD138+ Zielzellen (positive Fraktion), die mit Partikeln verbunden sind.

Im dritten Teilschritt sollten die magnetischen Dynabeads vom Antikörperkomplex und den Zielzellen gelöst werden. Die 4,5 µm großen Dynabeads würden in der Chromosomenbandenanalyse (CBA) oder FISH deutlich sichtbar sein und die Auswertung behindern. Das Ablösen geschah durch Hinzugabe von 250 µl DNase, welche den DNA-Linker zwischen magnetischem Dynabead und

Antikörperkomplex zerstörte. 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollmischer und vorsichtiges Durchpipettieren unterstützte die Wirksamkeit der DNase. Nun hatte die vormals immunomagnetisch markierte positive Fraktion ihren Magnetismus verloren.

Im vierten Teilschritt trennte ich die positive Fraktion von den losgelösten magnetischen Dynabeads. Die Suspension wurde wieder an den Magneten gestellt. Die losgelösten Dynabeads sammelten sich an der Wand vor dem Magneten und die CD138+ Zielzellen verblieben in der Suspension. Der Überstand wurde abpipettiert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Das Reaktionsgefäß mit der Suspension wurde vom Magneten genommen. Die verbliebenen Dynabeads wurden mit 2 ml Dynal-Puffer von der Wand gelöst und die Suspension wurde durchpipettiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt um möglichst viele magnetische Dynabeads aus der Suspension zu lösen.

Als Resultat erhielt ich eine CD138+ und eine CD138- Fraktion, die weiter bearbeitet werden konnten.

2.2.2.2 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenfreien Methode 2

Die von StemCell Technologies entwickelte automatisierte immunomagnetische Separation, findet in einem von einem Quadrupolmagneten erzeugten starken magnetischen Feld statt.

Bevor die automatisierte Separation startet, musste die Suspension aus Ziel- und Kontaminationszelllinie gewaschen und auf ein definiertes Volumen von 2 ml eingestellt werden. Dieses 2 ml Volumen ist für 2×10^6 Zellen ideal auf die Wirkung des Magneten (The Big Easy EasySep[®] Magnet) im Zellseparationsgerät (Robosep[®]) abgestimmt. Die 5 ml Suspension der Verdünnungsreihe wurde für 7 min bei 900 U zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in 12 ml Robosep-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1000 U wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet mit Robosep-Puffer auf 2 ml eingestellt. Die Suspension wurde zusammen mit Pipetten (TipRacks[®]), Puffer (Robosep[®] Buffer) und den immunomagnetischen Partikeln (EasySep[®] Human Whole Blood CD138 Positive Selection Cocktail, EasySep[®] Whole Blood Magnetic Nanoparticles) in das Zellseparationsgerät gegeben.

Während der Inkubation im Zellseparationsgerät bindet der tetramere Antikörperkomplex des EasySep® Human Whole Blood CD138 Positive Selection Cocktail zum einen an die Dextranhülle der magnetischen Partikel der EasySep® Whole Blood Magnetic Nanoparticles. Zum anderen bindet der tetramere Antikörperkomplex an das CD138 der Zielzellen. So werden die CD138+ Zielzellen immunomagnetisch markiert. Die immunomagnetisch markierten Zielzellen befanden sich in einem Reaktionsgefäß innerhalb des Quadrupolmagneten und blieben an der Wand des Reaktionsgefäßes haften. Die Zellen der Kontaminationszelllinie verblieben in der Suspension. Die Suspension mit den Zellen der Kontaminationszelllinie wurde aus dem Reaktionsgefäß entfernt und bildete die negative Fraktion. Diese Schritte geschahen im Programm Human CD138 WB positive Selection 18387 des Zellseparationsgerätes automatisch. Wurde das Reaktionsgefäß aus dem Zellseparationsgerät genommen, konnten die immunomagnetisch markierten Zielzellen mit Robosep-Puffer von der Wand des Reaktionsgefäßes abgelöst werden. Dies bezeichnete ich als die positive Fraktion. Die immunomagnetisch markierten Zielzellen wurden von der Suspension getrennt und standen für die CBA oder FISH zur Verfügung.

2.2.2.3 Immunomagnetische Zellseparation mit der säulenbasierten Methode 3

Die immunomagnetische Zellseparation mit der säulenbasierten Methode 3 besteht aus zwei Teilen. Erst erfolgt die Inkubation der kolloidalen Partikel mit den Zielzellen. Dann folgt die immunomagnetische Separation von Ziel- und Kontaminationszelllinie im starken magnetischen Feld einer ferromagnetischen Matrix in Säulen.

Während der immunomagnetischen Zellseparation mit Methode 3 muss auf eine konstante Temperatur der Suspension und aller Materialien von 4 °C geachtet werden, um unspezifische Bindungen oder einen Funktionsverlust der immunomagnetischen Partikel zu verhindern.

Die immunomagnetischen Partikel bei Methode 3 (CD138 MicroBeads) bestehen aus einem magnetisch beeinflussbarem Dextran-Eisen Kern konjugiert mit einem monoklonalen anti-human-CD138 Antikörper. Bei der Inkubation binden die kolloidalen 20-100 nm großen immunomagnetischen Partikel an die CD138+

Zielzellen. Die 5 ml Suspension der Verdünnungsreihe musste für 10 min bei 900 U zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 90 µl Puffer (MACS®Separation Buffer) gründlich resuspendiert. BSA oder EDTA als Inhaltsstoffe des Puffers sollten Zellaggregationen, welche die Ausbeute verringern, verhindern (Radbruch 2000). Dann wurden 10 µl des immunomagnetischen Partikels pro 5×10^6 Zellen in die Suspension gegeben. Während der 15 minütigen Inkubation sollte der monoklonale anti-humane Maus IgG1 Antikörper des immunomagnetischen Partikels an das CD138 der Zielzelle binden. Nach Zugabe von 2 ml Puffer wurde die Suspension für 10 min bei 700 U zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl Puffer gründlich resuspendiert. Die immunomagnetisch markierten Zielzellen konnten nun in einem magnetischen Feld von den Kontaminationszellen getrennt werden. Für die immunomagnetische Separation wurde die immunomagnetisch markierte Suspension in die Säulen (MS Columns) gegeben.

Die Säulen wurden vor der Zellseparation an einem Magneten (OctoMACS™) montiert. Durch Waschen mit 500 µl Puffer wurde die hydrophile Beschichtung der Säulenmatrix entfernt. So kann die in die Säulen gegebene Suspension schneller durch die Matrix durchlaufen. Der Magnet erzeugt zusammen mit den Säulen einen starken magnetischen Gradienten. Die immunomagnetisch markierten Zielzellen bleiben in der magnetischen Matrix der Säulen haften. Die Zellen der Kontaminationszelllinie laufen durch das magnetische Feld hindurch und können in einem Reaktionsgefäß als negative Fraktion gesammelt werden. Für eine größere Reinheit wird die mit den immunomagnetisch markierten Zielzellen beladene Säule dreimal mit je 500 µl Puffer gespült. Entfernt man die Säulen vom Magneten, löst sich der magnetische Gradient auf und die immunomagnetisch markierten Zielzellen können aus der Matrix entnommen und in einem Reaktionsgefäß als positive Fraktion gesammelt werden. Dazu löste ich die mit den Zielzellen beladene Säule vom Magneten und platzierte sie auf einem Reaktionsgefäß. Nach Zugabe von 1 ml Puffer wurden die immunomagnetisch markierten Zielzellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säulenmatrix in das Reaktionsgefäß gepresst.

Die weiterhin an den Zielzellen gebundenen immunomagnetischen Partikel sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen und wirken nicht störend bei der weiteren Aufarbeitung für die CBA oder FISH. So steht eine immunomagnetisch markierte

Zielzellsuspension zur Verfügung, die für CBA oder FISH weiter verwendet werden kann.

2.2.3. Chromosomenbandenanalyse

2.2.3.1 Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation für die Chromosomenbandenanalyse der immunomagnetisch separierten Fraktionen bestand aus vier Arbeitsschritten.

Der erste Schritt bestand in der Zugabe von 1 µg des Colchizinpräparates Colcemid® zu den Suspensionen der Verdünnungsreihe vor der immunomagnetischen Zellseparation. Colcemid arretiert die Chromosomen in der Metaphase durch Verhinderung der Bildung des Spindelapparates. Die Einwirkzeit im Brutschrank betrug 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Im zweiten Arbeitsschritt wurde den separierten Fraktionen eine hypotone Lösung zugefügt, damit die Zellen Wasser aufnehmen und die Chromosomen sich in dem größeren Zellvolumen besser verteilen konnten. Einem ersten Zentrifugationsvorgang für 10 Minuten bei 1000 U/min mit Abpipettierung und Resuspension des Pellets folgte die Zugabe von 7 ml 0,075 M KCL. Die Suspension inkubierte für 15 Minuten und wurde dann für 10 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert.

Im dritten Arbeitsschritt wurden die Chromosomen in einem eiskalten Ethanol-Essigsäure (3:1) Gemisch fixiert. Vor dem ersten Fixierschritt wurde der Überstand der KCl Lösung abpipettiert und das Pellet resuspendiert. 0,5 ml des Fixativs wurden dann tropfenweise bei 400 upm auf dem Vortexer hinzugegeben. Weitere 7 ml Fixativ wurden dann bei 600 upm des Vortexers zügig hinzugegeben. Der zweite und dritte Fixierschritt setzte sich aus Zentrifugation für 7 min bei 900 U/min, Abpipettieren, Resuspension und Zugabe von 7 ml Fixativ bei 600 upm auf dem Vortexer zusammen.

Im vierten Arbeitsschritt wurde die fixierte Suspension auf Objektträger (OT) aufgetropft. Die OT wurden vor dem Auftropfen 3 h lang in 100 % Ethanol gereinigt. Eine halbe Stunde vor dem Auftropfen wurden sie dreimal in Aqua dest. gespült und in Aqua dest. mit Eiswürfeln bedeckt für 5 min in den Kühlschrank gestellt. Die vorsichtig durchmischte Suspension wurde mit einer Glaspipette aufgenommen. Die entfetteten OT wurden in eine feuchte Kammer gelegt und die

Suspension wurde zügig auf den noch feuchten OT aufgebracht. Dazu wurden 7-9 Tropfen der Suspension mit senkrecht gehaltener Pipette mäanderförmig aufgetragen. Die Höhe aus der aufgetropft wurde, variierte, damit eine optimale Spreitung der Chromosomen und Verteilung der Metaphasen erreicht wurde. Die Chromosomen liegen nun fertig präpariert auf den OT vor und können nach Anfärbung analysiert werden.

2.2.3.2 GTG-Bänderung

Für die Analyse der Metaphasen wird die Darstellung von **G**-Banden mit Hilfe von Trypsin und **Gi**emsa gewählt, da diese Bänderung es ermöglicht Markerchromosomen zu erkennen und Metaphasen zur jeweiligen Zelllinie zuzuordnen (Wegner 1999).

Während zweistündiger Inkubation bei 75 °C auf der Heizplatte durchliefen die auf den OT fixierten Chromosomen einen Alterungsprozess, der das Aussehen und damit die Qualität der Metaphasen positiv beeinflusst. Dann wurden die OT zur enzymatischen Andauung in eine auf 37 °C angewärmte Trypsin- Puffer-Lösung gegeben, inkubierten dort zwischen 30 sec und 1,5 min, wurden zweimal in NaCl gewaschen und gelangten dann zum Anfärben für 7 min in ein Giemsa-Puffer-Gemisch. Bevor die OT lufttrockneten, wurde das überflüssige Giemsa durch zwei Waschvorgänge in Aqua dest. entfernt.

2.2.4 Statistische Auswertung der Zelllinienversuche

2.2.4.1 Anzahl an Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation

Um die Anzahl an Metaphasezellen zu ermitteln, untersuchte ich die GTG-gebänderten CD138+ OT der 50 % Fraktion.

Dafür wurde der OT der CD138+ 50 % Fraktion eines jeden Versuches mäanderförmig durchfahren. Die ersten 50 vorhandenen Metaphasen wurden mit dem Ikaros System aufgenommen. War die geforderte Anzahl von 50 Metaphasen auf dem untersuchten OT nicht vorhanden, wurde die Anzahl der insgesamt aufgenommen Metaphasen für diesen OT notiert.

Anschließend wurde die Differenz zwischen geforderter und tatsächlicher Anzahl an Metaphasen für jeden Versuch berechnet.

Die Differenz der einzelnen Versuche wurde nach Methode sortiert und für jede Methode summiert.

Aus der Summe der fehlenden Metaphasezellen pro Methode wurde im Verhältnis zur geforderten Anzahl an Metaphasezellen pro Methode die prozentuelle Ausbeute berechnet.

Um zu ermitteln ob die Methode oder die Zelllinie einen Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasen hat, wurde mit der Summe der fehlenden Metaphasezellen pro Methode und der Summe der fehlenden Metaphasezellen pro Zelllinie mit dem Statistikprogramm SPSS jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse berechnet. Für die Beurteilung der Effektstärke, also den Einfluss des jeweiligen Faktors auf die Varianz der Anzahl fehlender Metaphasen, wurde der R-Quadrat-Wert bestimmt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde jeweils als signifikant angegeben.

2.2.4.2 Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation

2.2.4.2.1 Analytische Qualität der Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation

Die analytische Qualität der Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation wurde anhand der Identifizierung des Markerchromosoms der Ziel- oder Kontaminationszelllinie beurteilt.

In den aufgenommenen Metaphasezellen der CD138+ 50 %-Experimente sollten die Markerchromosomen der Ziel- und Kontaminationszelllinie identifiziert werden. Hierzu wurden die aufgenommenen Metaphasezellen zunächst in zwei Kategorien auswertbar und unklar eingeteilt. Die Einteilung in die Kategorie "auswertbar" wurde vorgenommen, wenn die Identifikation der Markerchromosomen für Ziel- oder Kontaminationszelllinie am Ikaros Systems gelang. Konnte kein Markerchromosom sicher identifiziert werden, wurde die Metaphase in die Kategorie "unklar" eingeteilt.

Die kategorisierten Metaphasezellen wurden pro Methode und Zelllinie und pro Methode summiert. Es wurde der relative Anteil von auswertbaren Metaphasezellen zu unklaren Metaphasezellen bestimmt.

2.2.4.2.2 Vergleich der Reinheit der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode

2.2.4.2.2.1 Absolute Anzahl an richtig positiven Metaphasen

Um die Reinheit der säulenfreien Methode mit der säulenbasierten Methode vergleichen zu können, wurde die Anzahl der richtig positiven Metaphasezellen bestimmt.

Die Metaphasezellen der Kategorie der auswertbaren Metaphasezellen wurden anhand der Identifizierung des Markerchromosoms der Ziel- oder Kontaminationszelllinie in richtig positiv oder falsch positiv unterteilt. Geling die Identifizierung des Markerchromosoms der Zielzelllinie wurde die Metaphasezelle in die Fraktion richtig positiv eingeteilt. Geling die Identifikation der Kontaminationszelllinie wurde die Metaphase in die Fraktion falsch positiv eingeteilt. Die Anzahl der Metaphasezellen in der Fraktion richtig positiv wurde summiert.

2.2.4.2.2.2 Relative Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren

Um die Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation der säulenfreien Methoden mit der Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation der säulenbasierten Methode vergleichen zu können, wurden vier Parameter bestimmt.

Als erster Parameter wurde der relative Anteil der richtig positiven Metaphasen an allen auswertbaren Metaphasen pro Methode bestimmt. Dieser Wert wird im Folgenden als relative Reinheit der Methode bezeichnet.

Als zweiter Parameter wurde der Anteil der richtig positiven Metaphasen an allen auswertbaren Metaphasen für jeden der neun Versuche pro Methode bestimmt. Dieser Wert wird im Folgenden als relative Reinheit pro Versuch bezeichnet. Als dritten und vierten Parameter wurde der Median und Mittelwert der relativen Reinheit pro Versuch für jede Methode bestimmt.

2.2.4.3 Zytogenetische Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation

2.2.4.3.1 Allgemein

Die Überlagerung von Chromosomen oder umgekehrt die Abgrenzbarkeit ist ein wichtiges Kriterium für die Qualität einer Chromosomenpräparation und damit für das Gelingen einer Karyotypisierung, weil nur in voller Länge beurteilbare

Chromosomen für eine Analyse herangezogen werden können. Um den Einfluss des Verfahrens auf die Qualität der Metaphasen bei allen drei Methoden zu untersuchen, wurden die aufgenommenen Metaphasen hinsichtlich der Abgrenzbarkeit der einzelnen Chromosomen bewertet.

Die Abgrenzbarkeit wurde bestimmt als der Anteil der Chromosomen einer Metaphase, die keine Berührung mit anderen Chromosomen hatte. Der Anteil wurde anhand der aufgenommenen Metaphasen ermittelt.

Die Metaphasen wurden aufgrund des ermittelten Anteils einer der drei Kategorien von 100-75 % (Kategorie I), 75-50 % (Kategorie II) oder <50 % abgrenzbarer Chromosomen (Kategorie III) zugeordnet. Der prozentuelle Anteil wurde für jede Methode ermittelt

3. Ergebnis

3.1 Ergebnisse der Zelllinienversuche

3.1.1 Anzahl an Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation

3.1.1.1 Die Ausbeute an Metaphasezellen weicht von der geforderten Anzahl ab

In 16 von 27 Versuchen lag die Ausbeute an Metaphasezellen unter der geforderten Anzahl von 50 Metaphasezellen.

Beim Durchmustern des Objektträgers sollten die ersten 50 Metaphasezellen mit dem Ikaros System aufgenommen werden.

In Methode 1 lag in vier von neun Versuchen die geforderte Anzahl an Metaphasezellen nicht vor. Methode 2 und 3 zeigten in sechs von neun Versuchen weniger als 50 Metaphasezellen. (Tab.5)

Bei den beiden säulenfreien und der säulenbasierte Methoden lag eine unterschiedliche Ausbeute an Metaphasezellen vor.

Tabelle 5: Erzielte Metaphasezellen in den untersuchten Objektträgern der 50% Fraktion

		U266	OPM-2	RPMI-8226
Methode 1	Versuch 1	46	50	50
	Versuch 2	41	50	43
	Versuch 3	34	50	50
Methode 2	Versuch 1	3	50	47
	Versuch 2	6	49	50
	Versuch 3	6	50	2
Methode 3	Versuch 1	18	50	7
	Versuch 2	15	22	14
	Versuch 3	50	50	7

3.1.1.2 Zelllinien und Methoden haben Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasezellen

Durch eine einfaktorielle Varianzanalyse und die Berechnung des R-Quadrat-Wertes konnte ein gleich bedeutsamer Einfluss der Zelllinien und der Methoden auf die Ausbeute an Metaphasezellen bestätigt werden.

Als Einflussfaktoren auf die unterschiedliche Ausbeute an Metaphasezellen wurden die Zelllinien und die Methoden diskutiert. Um den Einfluss der beiden Faktoren zu bestätigen, wurde mit beiden Faktoren eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese ergab für die Methoden keinen signifikanten Unterschied ($p=0,51$). Für die Zelllinien ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,03$) Um die Effektstärke zu verdeutlichen wurde für beide Faktoren Methoden und Zelllinie der R-Quadrat-Wert bestimmt. Für die Methoden ergab sich ein Wert von 0,219 und für die Zelllinien 0,252. Die Varianz der fehlenden Anzahl an Metaphasen war zu 21,9% durch die Methoden und zu 25,2% durch die Zelllinien zu erklären. In der Interpretation der R-Quadrat-Werte bedeutete dies einen moderaten Effekt. Der Unterschied der R-Quadrat-Werte von Methode und Zelllinien war dabei nicht signifikant ($p=0,998$)

Das Ergebnis zeigte für die beiden Faktoren Zelllinie und Methode einen annähernd gleich bedeutsamen Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasezellen. Der Einfluss der Zelllinien war geringfügig größer.

3.1.1.3 Vergleich der Ausbeute an Metaphasezellen der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode

Um die säulenfreien Methoden hinsichtlich der Ausbeute an Metaphasezellen mit der säulenbasierten Methode zu vergleichen, wurden die fehlenden Metaphasezellen pro Methode summiert.

Methode 1 wies mit 36 fehlenden Metaphasezellen die kleinste Abweichung von den geforderten 450 Metaphasezellen auf. Methode 2 zeigte 187 fehlende Metaphasezellen. Methode 3 zeigte mit 217 fehlenden Metaphasezellen die größte Abweichung. (s. Abb.1, Tab. 6)

Um die Position von der säulenbasierten Methode 3 im Vergleich mit Methode 1 und 2 zu verdeutlichen, wurde der Anteil der tatsächlichen Ausbeute an Metaphasezellen an der geforderten Ausbeute an Metaphasezellen bestimmt. Der so berechnete prozentuelle Anteil wird im weiteren Verlauf als prozentuelle Ausbeute an Metaphasezellen bezeichnet.

Methode 1 wies eine prozentuelle Ausbeute von 92%, Methode 2 eine prozentuelle Ausbeute von 58,4% und Methode 3 eine prozentuelle Ausbeute von 51,7% auf.

Hinsichtlich der Ausbeute an Metaphasezellen war die säulenbasierte Methode 3 den säulenfreien Methoden 1 und 2 unterlegen. Die beste Ausbeute an Metaphasezellen erreichte die säulenfreie Methode 1.

Tabelle 6: Abweichung der Metaphasezellenanzahl von den geforderten 50 Metaphasezellen

		U266	OPM-2	RPMI-8226
Methode 1	Versuch 1	-4	-	-
	Versuch 2	-9	-	-7
	Versuch 3	-16	-	-
Summe				-36
Methode 2	Versuch 1	-47	-	-3
	Versuch 2	-44	-1	-
	Versuch 3	-44	-	-48
Summe				-187
Methode 3	Versuch 1	-32	-	-43
	Versuch 2	-35	-28	-36
	Versuch 3	-	-	-43
Summe				-217

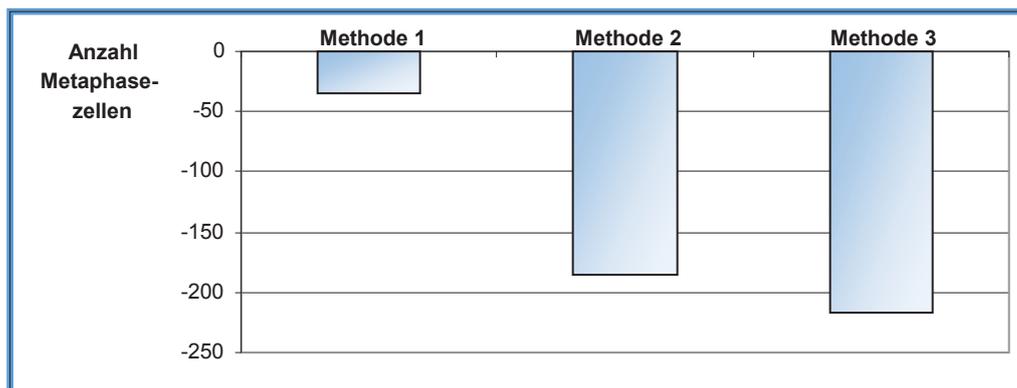


Abb 1: Summe der Abweichung der Anzahl der Metaphasezellen vom Zielwert 50 in Bezug zur verwendeten Methode. Die Anzahl der fehlenden Metaphasezellen wurde für jedes Verfahren ermittelt und als negativer Wert aufgetragen.

3.1.2 Reinheit der immunomagentischen Zellseparation

3.1.2.1 Analytische Qualität der Metaphasezellen nach immunomagnetischer Zellseparation

In allen drei Methoden lag ein Anteil auswertbarer und ein Anteil unklarer Metaphasezellen vor.

Die Einteilung in die Fraktion "auswertbar" wurde vorgenommen, wenn die Identifikation der Markerchromosomen für Ziel- oder Kontaminationszelllinie am Ikaros Systems gelang. Konnte kein Markerchromosom sicher identifiziert werden,

wurde die Metaphasezelle in die Kategorie unklar eingeteilt. In der weiteren Auswertung des Anteils der richtig positiven Metaphasezellen wurden die unklaren Metaphasezellen nicht mit einbezogen.

Methode 1 zeigte 71%, Methode 2 74 % und Methode 3 33 % auswertbare Metaphasezellen. Der Anteil unklarer Metaphasezellen lag bei Methode 1 bei 29%, bei Methode 2 bei 26% und bei Methode 3 bei 67%. (Abb.2 und Tab.7)

Somit wies Methode 2 die wenigsten unklaren Metaphasezellen und damit die höchste analytische Qualität auf.

Tabelle 7: Analytische Qualität der Metaphasezellen in Korrelation zu den verwendeten Verfahren und Zelllinie

	Markerchromosom erkennbar	U266	OPM-2	RPMI-8226	Summe	relativer Anteil
Methode 1	Ja	76	124	95	295	71%
	Nein	45	26	48	119	29%
Methode 2	Ja	10	128	56	194	74%
	Nein	5	21	43	69	26%
Methode 3	Ja	21	56	1	78	33%
	Nein	62	66	27	155	67%

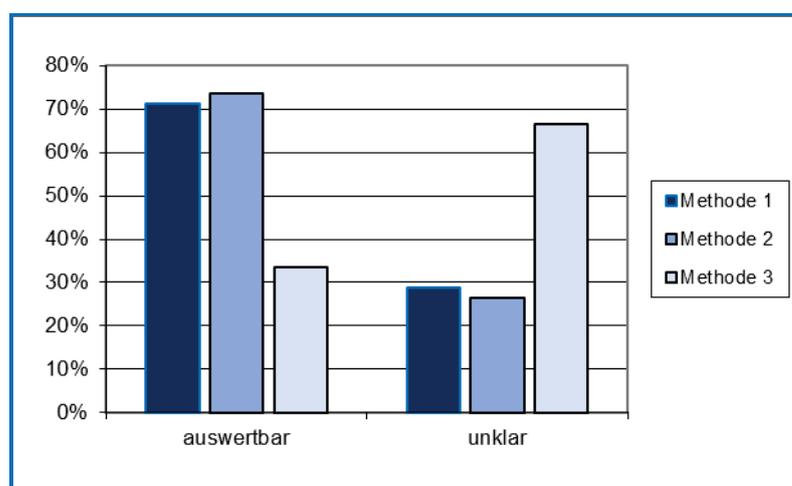


Abb. 2: Analytische Qualität der Metaphasezellen: Einteilung in auswertbare und nicht auswertbare Metaphasezellen. Die Metaphasezellen wurden je nach erkennbaren Markerchromosomen in auswertbar oder nicht auswertbar eingeteilt. Die Angaben sind in % an allen Metaphasezellen des jeweiligen Verfahrens

3.1.2.2 Vergleich der Reinheit der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode

3.1.2.2.1 Absolute Anzahl an richtig positiven Metaphasen

Um die Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren zu bestimmen, wurde die Anzahl der richtig positiven Metaphasezellen und die Anzahl der falsch positiven Metaphasen in den CD138 positiven Fraktionen bestimmt.

Die Einteilung wurde anhand der Identifizierung der Markerchromosomen von Ziel- oder Kontaminationszelllinie in der CD138+ -Fraktion der 50%-Experimente am Ikaros System vorgenommen.

Die Anzahl der richtig positiven Metaphasezellen variierte von 66 Metaphasen bei Methode 3, 143 richtig positiven Metaphasezellen bei Methode 2 bis zu 247 Metaphasezellen bei Methode 1 (s. Tab.8). In allen drei Verfahren übertraf die Anzahl der richtig positiven Metaphasen die Anzahl der falsch positiven Metaphasen.

Da die Anzahl der auswertbaren Metaphasen in den Verfahren stark variierte, können die absoluten Zahlen der richtig positiven Metaphasen nicht miteinander verglichen werden. (Abb. 3)

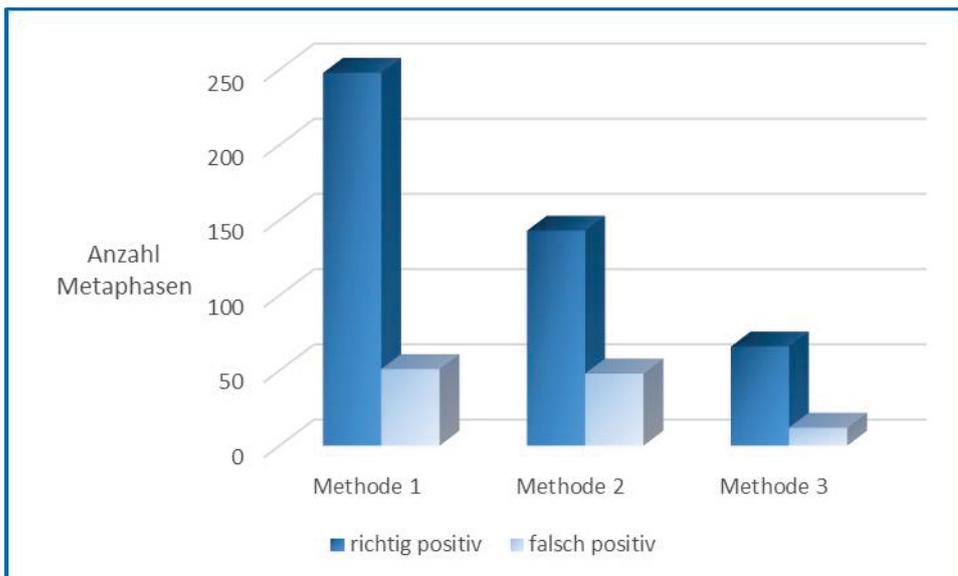


Abb. 3: Anteil der richtig und falsch positiven Metaphasen pro Verfahren. Die Anzahl der richtig positiven und falsch positiven Metaphasen wurde für jedes Verfahren ermittelt. Es sind die absoluten Werte für jedes Verfahren dargestellt

Tabelle 8: absoluter Anteil der richtig und falsch positiven Metaphasen pro Verfahren und die relative Reinheit pro Methode

	absolute Anzahl richtig positiver Zellen	Absolute Anzahl falsch positiver Zellen	relative Reinheit
Methode 2	143	51	74%
Methode 1	247	48	84%
Methode 3	66	12	85%

3.1.2.2.2 Relative Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren

Um die Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation der säulenfreien Methoden mit der säulenbasierten Methode zu vergleichen, wurden relative Werte bestimmt.

Es wurden die vier Parameter relative Reinheit der Methoden, relative Reinheit pro Versuch und der Median und Mittelwert der relativen Reinheit pro Versuch verglichen (s.Tab.8 und 9).

Methode 3 hatte die beste relative Reinheit der Methoden mit 85%, gefolgt von Methode 1 mit 84% und Methode 2 mit 74%. Die relative Reinheit pro Versuch schwankte bei Methode 3 zwischen 0% und 95%. Die relative Reinheit pro Versuch von 0% wurde bei Methode 3 in fünf von neun Versuchen beobachtet, so dass der Median von Methode 3 bei 0% liegt. Der Mittelwert für Methode 3 lag bei 35%. Die relative Reinheit pro Versuch schwankte bei Methode 2 zwischen 0 und 100 %. Der Mittelwert der relativen Reinheit pro Versuch lag bei Methode 2 bei 69%. Der Median lag bei 74%. Der Mittelwert der relativen Reinheit pro Versuch von Methode 1 lag 10% höher (79%). Die niedrigste relative Reinheit pro Versuch lag bei 23%. Die höchste relative Reinheit pro Versuch lag bei 100%. Somit lag auch der Median bei Methode 1 mit 87% höher, als der Median bei Methode 2.

Im Vergleich der relativen Reinheit der Methoden scheint die säulenbasierte Methode 3 den säulenfreien Methoden überlegen zu sein. Vergleicht man die vier Parameter relative Reinheit der Methoden, relative Reinheit pro Versuch, Median und Mittelwert aus der relativen Reinheit pro Versuch, sind die säulenfreien Methoden der säulenbasierten Methode überlegen.

Tabelle 9: Darstellung des relativen Anteils der richtig positiven Metaphasen pro Versuch; Mittelwert und Median aller Versuche pro Verfahren

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	Mittelwert	Median
Methode 1	63%	92%	100%	72%	84%	87%	23%	96%	95%	79%	87%
Methode 2	33%	61%	83%	0	69%	97%	100%	74%	100%	69%	74%
Methode 3	0	79%	0	50%	0	0	94%	96%	0	35%	0%

3.1.3 Zytogenetische Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation

3.1.3.1 Zytogenetische Qualität der säulenfreien Methoden im Vergleich mit der säulenbasierten Methode

Um die Qualität der säulenfreien und säulenbasierten Methoden zu untersuchen, wurde die Abgrenzbarkeit der Metaphasezellen der neun Versuche pro Methode bewertet und einer von drei Kategorien zugeordnet (s.Abb.4).

Bei Methode 1 konnten 42 % der Metaphasezellen der Kategorie I, 35 % der Kategorie II und 23 % der Kategorie III zugeteilt werden (s. Tab. 10). Bei der säulenfreien Methode 2 konnten 20% der Kategorie I, 41% der Metaphasezellen der Kategorie II und 39 % der Kategorie III zugeteilt werden (s. Tab. 10). Bei der säulenbasierten Methode 3 wurden 8 % der Metaphasezellen Kategorie I, 13 % Kategorie II und 79 % Kategorie III zugeteilt. (Abb.5)

Da bei der säulenbasierten Methode 3 dreiviertel der Metaphasezellen der dritten Kategorie zugeteilt wurden, ist die Abgrenzbarkeit der Metaphasezellen in diesem Verfahren schlecht. In der säulenfreien Methode 2 wurden die meisten Metaphasezellen der mittleren Kategorie zugeordnet. Die Abgrenzbarkeit der Metaphasezellen bei der säulenfreien Methode 2 ist eher mittelmäßig bis schlecht. Bei der säulenfreien Methode 1 wurden die meisten Metaphasezellen der besten Kategorie zugeordnet. Die Abgrenzbarkeit der Metaphasezellen bei Methode 1 ist gut bis mittelmäßig

Tabelle 10: Auflistung der Qualität aller Metaphasen nach verwendeter Methode

Kategorie	Methode 1		Methode 2		Methode 3	
	Anzahl Metaphasen	Anteil in %	Anzahl Metaphasen	Anteil in %	Anzahl Metaphasen	Anteil in %
I	172	42	52	20	20	8
II	147	35	109	41	30	13
III	95	23	102	39	183	79
Summe	414	100	263	100	233	100

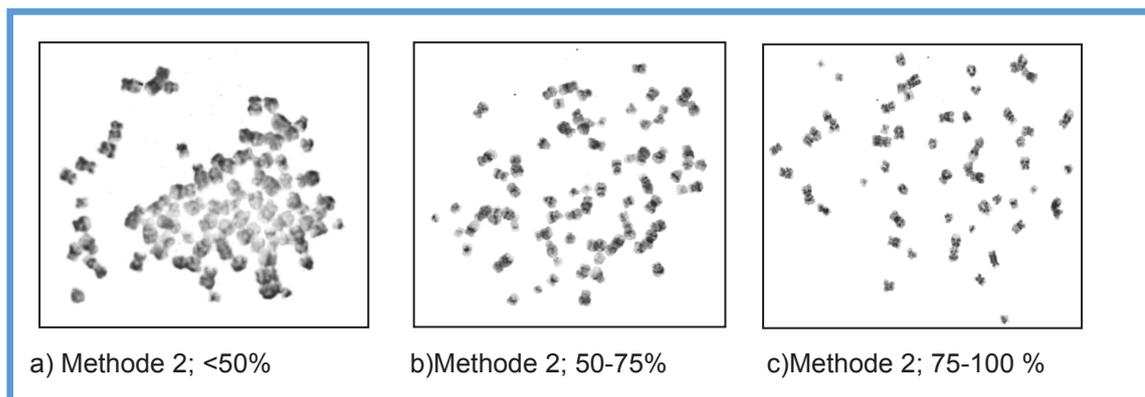


Abb. 4: Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 2. Beispiele aufgenommener Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 2 und der Zelllinie OPM-2. Die Einteilung erfolgte je nach Abgrenzbarkeit in die Kategorie a) <50%, b) 50-75% und c) 75-100%

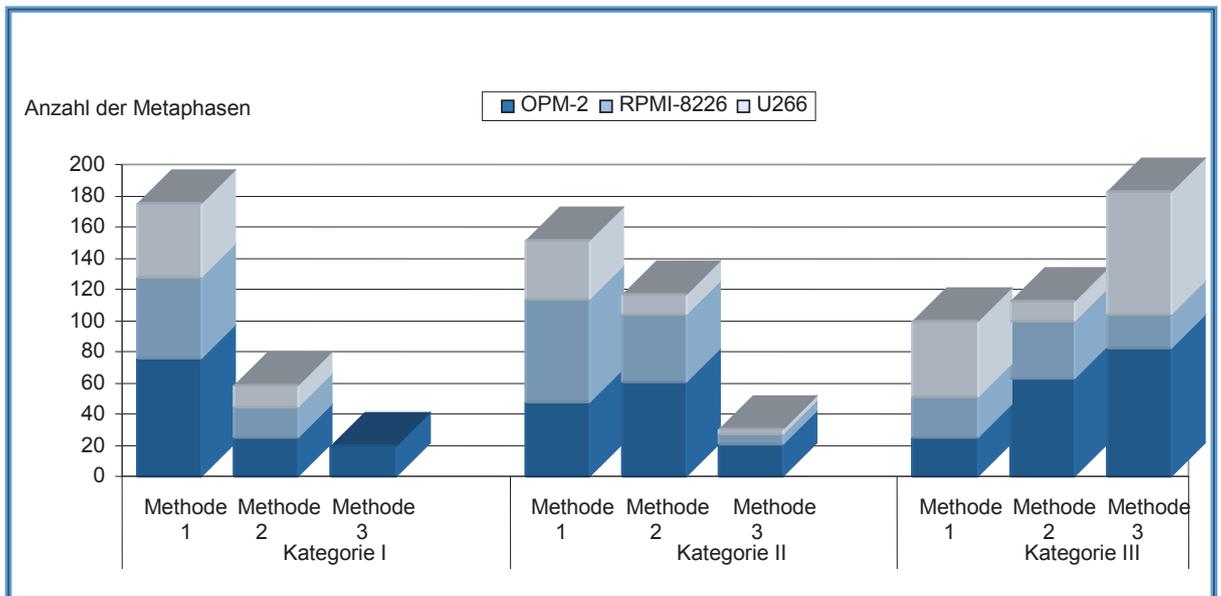


Abb. 5: Unterteilung der Metaphasezelle hinsichtlich der Abgrenzbarkeit der Chromosomen.

Die Metaphasen wurden in drei Kategorien 100-75% (I), 75-50% (II) und <50% (III) abgrenzbarer Chromosomen unterteilt. Aufgetragen sind die absoluten Werte nach Kategorie und Verfahren.

4. Diskussion

4.1 Vergleich der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren mittels Zelllinien

4.1.1 Anzahl der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation

4.1.1.1 Einfluss der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren auf die Anzahl an Metaphasen

Die immunomagnetischen Zellseparationsverfahren haben Einfluss auf die Anzahl der Metaphasezellen einer anschließenden CBA von MM-Zelllinien.

Die Ausbeute an Metaphasen wird durch die Zellzahl der Ausgangssuspension beeinflusst (Hawkins und Secker-Walker 1991). Je höher die Zellzahl, desto besser die Ausbeute an Metaphasen. Beim Durchmustern der Objektträger der CD138+ Fraktion sollten die ersten 50 Metaphasen mit dem Ikaros System aufgenommen werden. Von der angelegten Verdünnungsreihe wurde die 50 % Fraktion ausgewertet. Ich nahm an, dass eine Zahl von 1×10^6 Zellen/ml eine Ausbeute von 50 Metaphasen pro Versuch ergibt. Dies war in 16 von 27 Fällen nicht möglich.

Eine schlechte Ausbeute an Metaphasen bei der zytogenetischen Analyse des MM ist bekannt (Dewald et al. 1985b). Die Ausbeute an Metaphasen in der

zytogenetischen Analyse ist unter anderem abhängig vom Proliferationsindex der untersuchten Zellart. Plasmazellen weisen in Kultur einen niedrigen Proliferationsindex auf (Astaldi et al. 1968). Dies führt zu einer geringen Ausbeute an Metaphasen. Es ist also möglich, dass der Proliferationsindex der MM Zelllinien für die geringe Ausbeute an Metaphasen verantwortlich war.

Die Ausbeute an Metaphasen war in dieser Studie unterschiedlich. In 16 von 27 Versuchen war sie schlecht. In 11 von 27 Versuchen gelang die Anreicherung von 50 Metaphasen. Eine unterschiedliche Ausbeute an Metaphasen wird bei Cumova et al beschrieben. Sie erklären sich die unterschiedliche Ausbeute an Metaphasen durch eine unterschiedliche Anzahl an Plasmazellen in der Ausgangssuspension (Cumova et al. 2010). In dieser Studie wählte ich für jeden Versuch mit 2×10^6 Zellen/ml eine konstante Zellzahl für die Ziel- und Kontaminationszelllinie. In der 50 % Fraktion bedeutete dies eine konstante Zellzahl von 1×10^6 Zielzellen/ml. Die unterschiedliche Ausbeute an Metaphasezellen in dieser Studie konnte nicht durch eine unterschiedliche Zellzahl der Ausgangssuspension bedingt sein.

In meiner Untersuchung wurden die Ausgangssuspensionen vor der Aufarbeitung für die CBA immunomagnetisch separiert. Dabei wurden zwei säulenfreie Methoden 1 und 2 und eine säulenbasierte Methode 3 miteinander verglichen. Wynter et al fanden im Vergleich zwischen der säulenfreien Methode 1 und der säulenbasierten Methode 3 unterschiedliche Ausbeuten CD34+ Zellen nach immunomagnetischer Zellseparation vor (Wynter et al. 1999). In der Zusammenfassung mehrerer Studien beschrieben Kumar et al ebenfalls unterschiedliche Ausbeuten nach immunomagnetischer Zellseparation CD34+ oder CD133+ Zellen mit Methode 1 und 3 (Kumar et al. 2007). Die Anzahl der Zielzellen in der positiven Fraktion nach immunomagnetischer Separation ist abhängig von der Ausbeute der jeweiligen Methode. Je besser die Ausbeute, desto größer die Anzahl an Zielzellen der positiven Fraktion. Durch die unterschiedlichen Ausbeuten der Methoden kann trotz konstanter Zellzahl in der Ausgangssuspension nach immunomagnetischer Zellseparation je nach verwendeter Methode eine unterschiedliche Anzahl an Zielzellen in der positiven Fraktion vorliegen. Dies kann zu einer unterschiedlichen Ausbeute an Metaphasen führen.

Die Ausbeute an Metaphasen ist abhängig von der Anzahl an Zielzellen in der positiven Fraktion. Als Einflussfaktoren auf die Anzahl an Zielzellen in der positiven Fraktion und damit die Ausbeute an Metaphasen wurden der Proliferationsindex der Zelllinien und die Ausbeutewerte der Methoden diskutiert. In meiner Untersuchung zeigte sich ein Einfluss beider Faktoren, Zelllinie und Methode.

Abgesehen vom Proliferationsindex kann der CD138 Status der Zelllinien ein weiterer Aspekt für die unterschiedliche Ausbeute an Metaphasen sein. Zlei et al konnten zeigen, dass CD138 positive MM Zelllinien geringe Prozentsätze CD138 negativer Plasmazellen aufweisen. Die Zelllinie U266 zeigte 11-25% CD138 negative Plasmazellen (Zlei et al. 2007). In einer FACS-Analyse der U266 in meiner Studie zeigten sich 2,21 % CD138 negativer Plasmazellen. Weisen die Zelllinien OPM-2, U266 oder RPMI-8226 Anteile an CD138 negativen Plasmazellen auf, so verringert sich der Anteil an separierbaren CD138 positiven Zielzellen. Dies führt nach immunomagnetischer Zellseparation zu einer geringeren Anzahl an Zielzellen in der positiven Fraktion. So verringert sich auch die Ausbeute an Metaphasen. Sind die Anteile an CD138 negativen Zielzellen unterschiedlich hoch, führt dies zu einer unterschiedlichen Ausbeute an Metaphasen.

Zusätzlich konnten Zlei et al zeigen, dass mit zunehmender Kulturdauer der CD138 positive Status der Plasmazellen abnimmt. Dadurch könnte sich der Anteil an separierbaren CD138 positiven Plasmazellen und damit die Ausbeute an Metaphasen weiter verringern.

Der Einfluss der Methoden auf die unterschiedliche Ausbeute an Metaphasen wird durch unterschiedliche Ausbeutewerte der Methoden erklärt. Eine Ursache für die Unterschiede in den Ausbeutewerten der Methoden sind die unterschiedlichen Charakteristika der Methoden. Man unterscheidet säulenfreie und säulenbasierte Verfahren.

Methode 1 und 2 gehören zu den säulenfreien Verfahren. Die immunomagnetische Zellseparation findet im magnetischen Feld eines von außen angebrachten Magneten statt. Methode 3 gehört zu den säulenbasierten Verfahren. Durch Anbringen einer Säule mit einer ferromagnetischen Matrix an einen Magneten, wird ein magnetisches Feld innerhalb der Säule aufgebaut

(Zborowski 2008). Der Unterschied zwischen säulenfrei und säulenbasiert bedingt Unterschiede in den Arbeitsschritten. Die Suspension bei den säulenfreien Methoden verbleibt während der immunomagnetischen Zellseparation im Reaktionsgefäß. Durch den Einfluss des magnetischen Feldes von außen haften die Zellen an der Wand des Reaktionsgefäßes. Nach Aufheben des magnetischen Feldes könnten separierte Zellen an der Wand des Reaktionsgefäßes haften bleiben. Dies verringert die Anzahl der Zellen in der positiven Fraktion und dadurch die Ausbeute.

Bei der säulenbasierten Methode durchläuft die Suspension während der immunomagnetischen Zellseparation eine Säule. Es wäre möglich, dass dabei Zellen in der Säule haften bleiben und sich die Ausbeute von Methode 3 verringert (Zborowski 2008).

Der Unterschied zwischen säulenbasiert und säulenfrei bedingt auch Unterschiede in den immunomagnetischen Partikeln. Die Partikel bei Methode 1 sind 2,8-5 Mikrometer groß und damit deutlich größer, als die bis zu 5 Nanometer großen Partikel von Methode 2 und 3. Durch ihre Größe haben die Partikel von Methode 1 starke magnetische Kräfte und benötigen kein starkes magnetisches Feld. Gelangen die immunomagnetischen Partikel in ein magnetisches Feld, zieht der immunomagnetische Partikel die gekoppelte Zelle in Richtung des Magneten. Dies führt zu starken Scherkräften, die der Zelle schaden könnten. Zellschaden kann zu Zellverlust und damit zu einer geringen Ausbeute führen.

Die Auswahl der immunomagnetischen Methode bei MM-Zelllinien hat einen Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasen in einer anschließenden CBA. Ziel der Arbeit war es, zu klären welche Methode hinsichtlich der Ausbeute an Metaphasen am Besten ist, indem sie am wenigsten von der geforderten Anzahl abweicht.

4.1.1.2 Vergleich der säulenbasierten und säulenfreien Methoden im Hinblick auf die Anzahl an Metaphasen

In der Ausbeute an Metaphasen war die säulenbasierte Methode den säulenfreien Methoden unterlegen.

Die säulenbasierte Methode 3 wies mit einer Ausbeute von 51,7% Metaphasen eine geringere prozentuelle Ausbeute auf als die säulenfreien Methoden mit prozentuellen Ausbeuten von 92% (Methode1) und 58,6% (Methode2).

Wie in 4.1.1 angesprochen ist die Ausbeute an Metaphasen abhängig von der Anzahl an Zielzellen in der positiven Fraktion. Die Ausbeutewerte der Methoden geben den prozentuellen Anteil an Zielzellen in der positiven Fraktion wieder. Je besser der Ausbeutewert, desto besser die mögliche Ausbeute an Metaphasen. Wynter et al haben die Ausbeutewerte von CD34 Separationen mit Methode 3 aus fünf Zentren zusammengetragen. Im Mittel lag dort eine Ausbeute von 53% (+/- 16%) vor (Wynter et al. 1999). Zlei et al wechselten nach nicht genannten schlechten Ausbeutewerten mit Methode 3 zur säulenfreien Methode 2 (Zlei et al. 2007). Die säulenbasierte Methode 3 weist schlechte Ausbeutewerte auf. Durch die schlechten Ausbeutewerte ist die Ausbeute an Metaphasen gering.

Eine mögliche Ursache für die geringen Ausbeutewerte scheint die Separation an den Säulen zu sein. Kekarainen et al wollten bei der immunomagnetischen Separation von CD34+ Zellen mit Methode 3 die Reinheit der positiven Fraktion durch eine zweite Separation verbessern. Die verbesserte Reinheit ging aber mit einem Verlust an Zielzellen einher (Kekarainen et al. 2006). Eine zweite immunomagnetische Separation bei Methode 3 führt zu einer geringeren Ausbeute.

Die immunomagnetische Zellseparation bei Methode 3 findet in einer Säulenmatrix statt. Die ferromagnetische Matrix der Säule baut, wenn sie in einem magnetischen Feld platziert wird, in der Säule einen magnetischen Gradienten auf. Die mit Partikeln beladenen Zielzellen bleiben im magnetischen Gradienten haften. Die unbeladenen kontaminierenden Zellen laufen durch die Säule hindurch. Die Säulen sind unterschiedlich groß und auf definierte Zellzahlen abgestimmt. Verwendet man für eine definierte Zellzahl eine zu kleine Säule, wird die Matrix überladen und Zielzellen laufen durch die Säule hindurch (Zborowski 2008). So gelangen Zielzellen in die negative Fraktion und der Anteil an Zielzellen in der positiven Fraktion verringert sich. Wir verwendeten die MS Columns. Diese sind für eine Zielzellzahl bis 10^7 Zellen ausgelegt. Die Zielzellzahl in meinen Versuchen betrug 10^6 Zielzellen und war damit kleiner als die maximale Zielzellzahl von 10^7 Zellen. Es sollte daher zu keiner Überladung der Säulen und dadurch bedingten Zellverlusten gekommen sein.

Die ferromagnetische Matrix der Säule kann durch direkten Kontakt mit den Zellen zu Zellschaden und damit zu Verlust der Zellen führen (Radbruch 2000). Um dies zu vermeiden, wurde die Matrix mit einer biokompatiblen Plastikmembran überzogen.

Ob trotz biokompatibler Membran Zielzellen durch die ferromagnetische Matrix geschädigt werden oder Zielzellen in der Säule haften bleiben, muss geklärt werden. Fest steht, dass immunomagnetische Zellseparation mit Methode 3 zu einem Verlust an Zielzellen in der positiven Fraktion führt. Dies bedingt geringe Ausbeutewerte und eine geringe Ausbeute an Metaphasen.

Methode 2 separiert im magnetischen Feld eines Quadrupolmagneten, ohne dass die Suspension mit einer Matrix in Kontakt kommt. Bei der immunomagnetischen Zellseparation mit Methode 2 wurden Ausbeutewerte >90% erzielt (Chalmers et al. 1998).

Die Ausbeute an Metaphasen in meiner Studie lag mit 58,6% aber um 30% unter den Ausbeutewerten von Chalmers et al. Es gibt eine Diskrepanz zwischen der Ausbeute an Zielzellen mit Methode 2 und der Ausbeute an Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 2. Von den vielen Zielzellen nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 2, konnten wenige Zellen in der Metaphase arretiert werden.

In der säulenfreien Methode 1 verhält es sich umgekehrt. In der Multizentren Studie von Wynter et al wurden die Ergebnisse der immunomagnetischen Separation mit Methode 1 aus fünf Zentren zusammengetragen. Im Durchschnitt lag hier eine Ausbeute von 31,2% vor. Dabei variierten die Ausbeutewerten an den einzelnen Zentren von 4,4% - 65,7% (Wynter et al. 1999). In anderen Studien lagen die Ausbeutewerte mit Methode 1 bei >30% (Chalmers et al.) Die prozentuale Ausbeute an Metaphasen in dieser Studie betrug 92,2%. Trotz geringer Ausbeutewerte ist die Ausbeute an Metaphasen gut. Von den wenigen Zielzellen nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 1 konnten viele Zellen in der Metaphase arretiert werden. Es scheint, dass die Erklärung für die gute Ausbeute an Metaphasen dieser Methode nicht mit den Ausbeutewerten anderer Studien zusammenhängt. Charakteristika von Methode 1 wie die Scherkräfte können die schlechte Ausbeutewerte der anderen Studien erklären.

Sie sind aber keine Erklärung für die gute Ausbeute an Metaphasen in dieser Studie.

Ein anderer noch nicht genannter Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasen kann die Einwirkzeit des Cholchizinpräparates Colcemid sein. Durch Verhinderung der Bildung des Spindelapparates arretiert es die Zellen in der Metaphase. In der Metaphase liegen die Chromosomen in optimaler Länge vor, um sie später nach G-Bänderung analysieren zu können. Dabei hat die Konzentration des Colcemid und die Dauer der Einwirkzeit Einfluss auf die Anzahl der Zellen, die in die Metaphase eintreten (Webber und Garson 1983; McFee et al. 1997). Die Konzentration war in dieser Studie für alle Methoden gleich. Sie sollte daher keine Unterschiede in der Ausbeute der Metaphasen bewirkt haben. Für die Einwirkzeit gilt, je länger es einwirkt, desto mehr Zellen werden in der Metaphase angereichert und desto größer ist die Ausbeute an Metaphasezellen (McFee et al. 1997; Webber und Garson 1983). Die Einwirkzeit vor Beginn der immunomagnetischen Separation war mit zwei Stunden bei allen Methoden gleich. Bei Methode 2 und 3 folgte nach zwei Stunden ein Waschschrift, der die Wirkung des Colcemid beendete. Bei Methode 1 erfolgte dieser erst 30-40 Minuten später nach der immunomagnetischen Separation. Das Colcemid konnte 30-40 Minuten länger wirken. Dies ist möglicherweise entscheidend für die bessere Ausbeute an Metaphasen. Es ist aber fraglich, ob der Vorteil der guten Ausbeute an Metaphasen zu Lasten einer schlechteren Qualität der Metaphasen geht. Dieser Aspekt wird in einem späteren Abschnitt diskutiert.

Für eine anschließende CBA der MM-Zellen ist das säulenbasierte Verfahren aufgrund einer geringeren Ausbeute an Metaphasen schlechter geeignet als die säulenfreien Verfahren. Mit Methode 1 erhält man die meisten Metaphasen für eine anschließende CBA.

Ein weiteres Qualitätsmerkmal der immunomagnetischen Zellseparation ist die Reinheit der positiven Fraktion. Es stellt sich die Frage, ob die gute Ausbeute von Methode 1 womöglich auf einer schlechten Reinheit beruht. Dies wird im weiteren Verlauf diskutiert.

4.1.2 Reinheit der immunomagnetischen Zellseparation

4.1.2.1 Anteil unklarer Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation

Konnte in einer Metaphase kein Markerchromosom identifiziert werden, das eine sichere Zuordnung zur Ziel- oder Kontaminationszelllinie erlaubte, so wurde die Metaphase in die Kategorie unklar eingeteilt.

Bei allen getesteten Methoden blieben in den positiv selektierten Fraktionen der Metaphasezellen unklar bezüglich ihrer Herkunft von Ziel- oder Kontaminationszellen. Der Anteil dieser Metaphasen war bei Methode 1 und 2 geringer als bei Methode 3.

Ein Anteil unklarer Metaphasen überrascht nicht, da die Identifizierung eines Markerchromosoms aus verschiedenen Gründen häufig nicht gelingt. Daher findet sich auch in anderen Studien mit zytogenetischer Analyse von Plasmazellen beim MM oder zytogenetischer Analyse einer ALL ein Anteil nicht analysierbarer Metaphasen (Hawkins und Secker-Walker 1991; Hussein et al. 2008).

Zum einen ist die Spreitung der Chromosomen entscheidend für das Auffinden des Markerchromosoms. Optimale Spreitung bedeutet eine Verteilung der Chromosomen innerhalb der Metaphase ohne Überlappungen der Chromosomen. Die Höhe aus der aufgetropft wird, sowie die Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur bei der Evaporation des Fixativs beeinflussen die Spreitung (Hliscs et al. 1997; Claussen et al. 2002). Eine schlechte Spreitung führt zu vielen überlappenden Chromosomen. Dann kann das Markerchromosom nicht erkannt werden, da es von anderen Chromsomen zu stark überlagert wird.

Zum anderen kann die Länge der Chromosomen Auswirkungen auf die Identifikation eines Markerchromosoms haben. Kleine kondensierte Chromosomen sind schlechter zu identifizieren als lange (Yunis 1981).

Optimale Spreitung und Kondensierung der Chromosomen sind Qualitätsmerkmale einer CBA und werden in einem späteren Abschnitt weiter diskutiert.

Der Unterschied der säulenbasierten Methode 3 (67% unklare Metaphasen) zu den säulenfreien Methode 1 (29%) und 2 (27%) erklärt sich durch die schlechte Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Separation mit Methode 3 (s. Abb. 2 und Tab. 7). Die Chromosomen sind überlagert und stark kondensiert, weshalb die Identifikation des Markerchromosoms nicht gelingt.

Die schlechte Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation mit der säulenbasierten Methode 3 führt zu einem hohen Anteil nicht auswertbarer Metaphasen. Der Anteil nicht auswertbarer Metaphasen mit den säulenfreien Methoden 1 und 2 ist geringer. Für eine weitere Analyse der Metaphasen scheinen die säulenfreien Methoden besser geeignet zu sein.

4.1.2.2 Reinheit der CD138+ Fraktion nach immunomagnetischer Zellseparation

Das säulenfreie Verfahren mit Methode 1 hat nach immunomagnetischer Zellseparation die höchste Reinheit.

Um die Reinheit der immunomagnetischen Zellseparationsverfahren zu bestimmen, wurde die Anzahl der richtig positiven Metaphasen und die Anzahl der falsch positiven Metaphasen in den CD138 positiven Fraktionen bestimmt. Die Einteilung erfolgte anhand der Identifizierung der Markerchromosomen von Ziel- oder Kontaminationszelllinie in der CD138+ -Fraktion der 50%-Experimente am Ikaros System. Aus den ermittelten Werten wurden der relative Anteil, Mittelwert und Median ermittelt.

Im Hinblick auf den relativen Anteil der richtig positiven Metaphasen an allen auswertbaren Metaphasen hat Methode 3 mit 85% Reinheit den höchsten Wert. Methode 1 folgte mit einem Prozentpunkt Abstand. Methode 2 hatte eine Reinheit von 74%.

Nach immunomagnetischer Zellseparation sollten nur Zellen der Zielzelle in der positiven Fraktion vorliegen. Die Ursache für das Vorkommen der Kontaminationszelllinie in der positiven Fraktion liegt in der Interaktion von immunomagnetischem Partikel und Oberflächenantigen der Zellen. Die hier verwendeten immunomagnetischen Partikel bestehen unter anderem aus einem Antikörper, der spezifisch gegen CD138 ein Oberflächenantigen der malignen Plasmazellen gerichtet ist. Bei der Inkubation von immunomagnetischen Partikeln und Suspension binden die Antikörper auf den immunomagnetischen Partikeln an das CD138 Oberflächenantigen der malignen Plasmazelle. Die Kontaminationszelllinie K562 exprimiert kein CD138 Oberflächenantigen. Trotzdem kann es zu unspezifischen Bindung von immunomagnetischen Partikeln

an Oberflächenantigene der Kontaminationszelllinie kommen. Dieser unspezifisch gebundene Partikel-Zell-Komplex gelangt wie auch der spezifische Partikel-Zell-Komplex nach der immunomagnetischen Separation in die positive Fraktion. Der Anteil der unspezifischen Bindungen ist von bestimmten Faktoren abhängig.

Für Methode 1 konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation länger als 60 Minuten oder eine Anzahl an Partikeln $>1 \times 10^8/\text{ml}$ zu einer größeren Anzahl an unspezifischen Bindungen führt (Kumar et al. 2007). Die Inkubationszeit bei Methode 1 betrug dreißig Minuten und die Partikelzahl lag mit 4×10^7 Partikeln/ml unter den 1×10^8 Partikeln/ml.

Zborowski et al vermuten, dass die Mikrometer großen Partikel der Methode 1, im Vergleich zu den Nanometer großen Partikel der Methode 2 und 3, vermehrt zu unspezifischen Bindungen führen. Dies könnte eine schlechtere Reinheit von Methode 1 bedingen. Tatsächlich ist die Reinheit von Methode 1 in dieser Studie vergleichbar mit Methode 3 und mit Werten anderer Studien. Avet-Loiseau, Largo und Chen konnten in ihren Studien mit immunomagnetischer Separation mit Methode 3 Reinheiten von 70-99% erzielen. (Chen et al. 2005; Avet-Loiseau et al. 2007; Largo et al. 2007) Bei Rieder et al wies die immunomagnetische Separation mit Methode 1 eine Reinheit von 95,2 % auf.

Die Reinheit von Methode 2 weicht mit 74% in dieser Studie von der Reinheit der anderen zwei Methoden und von der Reinheit anderer Studien mit Methode 2 ab. Kline et al oder Arendt et al wiesen in ihren Studien mit immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 2 an CD138+ Plasmazellen Reinheiten von $>95\%$ auf und waren somit besser als die Ergebnisse dieser Studie. (Kline et al. 2007; Arendt et al. 2008)

Des weiteren wurde die relative Reinheit aller Versuch mit den relativen Reinheiten für die einzelnen Versuche und den daraus ermittelten Mittelwerten und Medianen verglichen.

Mittelwert und Median der relativen Reinheit aus den neun Versuchen liegen bei Methode 3 bei 35% bzw. 0%. Dies ist ein großer Unterschied zur relativen Reinheit von 85%.

Kekarainen et al hatten in ihrer Studie nach immunomagnetischer Zellseparation mit Methode 3 eine Reinheit von $<50\%$. Sie änderten daraufhin das Protokoll. Mit einer zusätzlichen Kopplung und einem zusätzlichen Separationsschritt, konnten sie die Reinheit auf $>90\%$ steigern (Kekarainen et al. 2006). Wir führten bei

Methode 3 nur eine Kopplung und eine Separation durch. Bei der automatisierten Version von Methode 3 sollen je nach Zellzahl der Ausgangssuspension verschiedene Programme angewandt werden. Für eine BM-Infiltration <10% wird eine doppelte positive Separation empfohlen. Cumova et al konnten dann eine Reinheit von 83,7% nachweisen. Bei einer KM-Infiltration von >10% konnten sie mit einmaliger Separation eine Reinheit von 92,6% nachweisen. Der Anteil an Zielzellen in der Ausgangssuspension betrug in dieser Studie 50%. Mit einmaliger Separation mit Methode 3 hätten demnach bessere Reinheiten in den einzelnen Versuchen erzielt werden müssen.

Ein Unterschied von dieser Studie zu den anderen ist die Ermittlung der Reinheit. Während Chen et al oder Avet-Loiseau et al die Reinheit anhand der Zellmorphologie ermittelten, wendeten Cumova et al eine FACS Analyse an. Wir bestimmten die Reinheit anhand der Identifikation von Markerchromosomen in Metaphasen. Die Ermittlung der Reinheit ist dadurch abhängig vom Vorhandensein und der Qualität der Metaphasen. Methode 3 weist insgesamt nur 33% auswertbare Metaphasen auf. In 67% der Metaphasen konnte das Markerchromosom, wahrscheinlich aufgrund der schlechten Qualität, nicht identifiziert werden. In fünf Versuchen konnte dadurch keine Metaphase der Zielzelllinie zugeordnet werden, was zu dem schlechten Mittelwert von 36% und dem schlechten Median von 0% geführt hat. Die Identifizierung anhand der Markerchromosomen wurde bewusst vorgenommen. Möchte man im Anschluss an die immunomagnetische Zellseparation eine zytogenetische Analyse durchführen, benötigt man eine gute Qualität an Metaphasen. Misslingt die Identifizierung eines Markerchromosoms durch niedrige Ausbeute oder schlechte Qualität der Metaphasen, wie bei Methode 3, scheint diese Methode für eine zytogenetische Analyse schlechter geeignet zu sein.

Bei Methode 1 sind die relativen Werte für relative Reinheit pro Methode (84%), sowie Median (87%) und Mittelwert (79%) aus allen neun Versuchen annähernd konstant. Ähnliche Werte wies auch das beste Zentrum in der Multizentren Studie von Wynter et al auf. Das schlechteste Zentrum lag mit einer Reinheit von 3,1-75% deutlich darunter. Wynter et al vermuten, dass die schlechte Reinheit auf Fehler durch den Separateur zurückzuführen ist.(Wynter et al. 1999) Tatsächlich erfolgt die immunomagnetische Separation bei Methode 1 in vielen Arbeitsschritten per Hand. Das macht sie anfällig für Fehler.

Methode 2 weist aus dem relativen Anteil der richtig positiven Metaphasezellen aller neun Versuche einen Median von 74% und einem Mittelwert von 69% auf. Diese Werte gleichen ebenfalls der relativen Reinheit pro Methode (74%).

Die beste Reinheit nach immunomagnetischer Zellseparation erreicht im Hinblick auf die relative Reinheit und die Mittelwerte und Mediane der Versuche Methode 1. Die Reinheit von Methode 3 leidet in dieser Studie unter der schlechten Ausbeute und Qualität der Chromsomen.

Die anhand der Identifizierung von Markerchromosomen ermittelte Reinheit der säulenfreien Methoden 1 und 2 spricht für die Anwendung von immunomagnetischer Zellseparation und anschließender CBA dieser Methoden. Die säulenbasierte Methode 3 scheint in einer anschließenden CBA den säulenfreien Methoden unterlegen zu sein.

4.1.3 Qualität der Metaphasen nach immunomagnetischer Zellseparation

Die Qualität der Metaphasen der säulenfreien Methoden ist besser als die Qualität der Metaphasen der säulenbasierten Methode.

Hinsichtlich der Abgrenzbarkeit der Metaphasen waren mit 42% die meisten Metaphasen der säulenfreie Methode 1 zu 100-75% abgrenzbar. Bei Methode 2 waren mit 41% die meisten Metaphasen zu 75-50% abgrenzbar. Bei der säulenbasierten Methode 3 waren 79% der Metaphasen <50% abgrenzbar.

Die Qualität einer Chromosomenpräparation wird anhand der Länge und Spreitung der Chromosomen bestimmt. Optimale Spreitung der Chromosomen beinhaltet eine gute Verteilung der Chromosomen mit wenigen Überlappungen (Yunis 1981, 1976). Wir verwendeten das Kriterium der Abgrenzbarkeit der Chromosomen innerhalb der Metaphase. Liegt eine gute Abgrenzbarkeit der Chromosomen einer Metaphase vor, überlappen sich die Chromosomen nicht und sind gut voneinander abgrenzbar. Eine gute Abgrenzbarkeit ist somit ein Faktor für eine optimale Spreitung.

Einen großen Einfluss auf die Spreitung der Chromosomen übt die Chromosomenpräparation aus. Die Arbeitsschritte der Chromosomenpräparation von der Zugabe der hypotonen Lösung, Fixierung im Ethanol-Essigsäure-Gemisch, Auftropfen der Suspension bis zur GTG-Bänderung können die

Spreitung der Metaphasen beeinflussen. Beispielsweise können Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit während der Evaporation des Fixativs auf dem OT die Spreitung der Chromosomen beeinflussen (Hliscs et al. 1997; Claussen et al. 2002; Deng et al. 2003). Verändert man einen dieser Schritte von einem Versuch zum nächsten, führt das zu Unterschieden in der Qualität der Chromosomen. In dieser Studie wurden diese Arbeitsschritte nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt. So wurden Abweichungen zwischen den Versuchen reduziert. Außerdem wurde die Chromosomenpräparation von einer einzigen Person durchgeführt. Das verhindert Abweichungen, die durch die unterschiedliche Erfahrung und Handhabung der Arbeitsschritte zwischen Personen entstehen könnten. Der Einfluss der Art der Chromosomenpräparation kann somit als Faktor für die unterschiedliche Qualität der Metaphasen der Versuche ausgeschlossen werden.

Methode 1 weist mit 42% Metaphasen in der 100-75% Kategorie die beste Qualität auf.

Ein weiterer Faktor für die Qualität der Chromosomen ist die Konzentration und die Einwirkzeit des Cholchizinpräparates Colcemid. Durch Verhinderung der Bildung des Spindelapparates arretiert Colcemid die Zellen in der Metaphase. Die Einwirkzeit vor Beginn der immunomagnetischen Separation war mit 2 h bei allen Methoden gleich. Bei Methode 2 und 3 folgte nach 2 h ein Waschschrift, der die Wirkung des Colcemid beendete. Bei Methode 1 erfolgte dieser erst 30-40 min später nach der immunomagnetischen Separation. Das Colcemid konnte 30-40 min länger wirken. Eine verlängerte Einwirkzeit des Colcemid führt nicht zwangsläufig zu einer besseren Qualität der Chromosomen. Je länger das Colcemid wirkt, desto mehr kondensieren die Chromosomen. Bei optimaler Einwirkzeit führt dies zu optimal kondensierten Chromosomen, die gut zytogenetisch analysiert werden können. Ist die Einwirkzeit zu lang, kann dies zu Überkondensation führen. Diese Chromosomen sind dann von schlechter Qualität und können nicht zytogenetisch analysiert werden (McFee et al. 1997). Trotzdem scheint die um 30-40min verlängerte Einwirkzeit bei Methode 1 zu einer guten Qualität der Chromosomen geführt zu haben. Damit scheint diese Einwirkzeit optimal für eine gute Qualität der Chromosomen der malignen Plasmazellen.

Die längere Einwirkzeit des Colcemid bei Methode 1 erklärt aber nicht die Unterschiede in der Qualität der Chromosomen zwischen säulenbasierter und

säulenfreier Methode. 79% der Metaphasen mussten bei säulenbasierter Methode 3 der schlechtesten Kategorie zugeordnet werden. Die meisten Metaphasen bei Methode 2 konnten in die zweitbeste Kategorie eingeordnet werden. Trotz gleich langer Einwirkzeit des Colcemid von 2 Stunden weisen die Methoden eine unterschiedliche Qualität auf.

Eine weitere Variable dieser Studie ist die säulenfreie und säulenbasierte Zellseparation vor CBA. Wir vermuteten einen Einfluss der unterschiedlichen immunomagnetischen Zellseparationsverfahren auf die Qualität von Metaphasen. Durch den Unterschied zwischen den säulenfreien Methoden 1 und 2 und der säulenbasierten Methode 3 in der Einteilung konnten wir die Vermutung bestätigen. Die säulenbasierte Methode 3 hat die schlechteste Qualität.

Für eine anschließende CBA nach immunomagnetischer Zellseparation ist das säulenbasierte Verfahren aufgrund schlechter Qualität schlechter geeignet als die säulenfreien Verfahren. Die beste Qualität erreicht man mit der säulenfreien Methode 1.

Schlussfolgerung

Immunomagnetische Zellseparation und anschließende CBA bei MM-Zelllinien lässt sich durch die Wahl der Methode beeinflussen.

Die Auswahl der immunomagnetischen Methode bei MM-Zelllinien hat einen Einfluss auf die Ausbeute an Metaphasezellen in einer anschließenden CBA. Das säulenbasierte Verfahren ist aufgrund einer geringeren Ausbeute an Metaphasezellen schlechter geeignet als die säulenfreien Verfahren.

Aufgrund schlechter Qualität der MM-Metaphasezellen ist das säulenbasierte Verfahren für eine CBA nach immunomagnetischer Zellseparation schlechter geeignet als die säulenfreien Verfahren. Die beste Qualität erreicht man mit der säulenfreien Methode 1.

Für eine immunomagnetische Zellseparation mit anschließender CBA empfiehlt sich die Verwendung der säulenfreien Methoden. Ob sich die Ergebnisse der Zelllinienuntersuchungen auf Patientenanalysen übertragen lassen, muss noch gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group (2003). In: *Br. J. Haematol.* 121 (5), S. 749–757.
- Gertz, Morie A.; Greipp, Philip R.; Dispenzieri, Angela (2004): Hematologic malignancies. Multiple myeloma and related plasma cell disorders ; 59 tables /// Multiple myeloma and related plasma cell disorders. Berlin u.a. /// Berlin: Springer.
- Arendt, Bonnie K.; Ramirez-Alvarado, Marina; Sikkink, Laura A.; Keats, Jonathan J.; Ahmann, Gregory J.; Dispenzieri, Angela et al. (2008): Biologic and genetic characterization of the novel amyloidogenic lambda light chain-secreting human cell lines, ALMC-1 and ALMC-2. In: *Blood* 112 (5), S. 1931–1941.
- Astaldi, G.; Eridani, S.; Ponti, G. B. (1968): The proliferative activity of plasma cells from plasmocytoma in vitro. In: *Eur J Cancer* 4 (1), S. 9–13.
- Avet-Loiseau, Hervé (2007): Role of genetics in prognostication in myeloma. In: *Best Pract Res Clin Haematol* 20 (4), S. 625–635.
- Avet-Loiseau, Hervé; Attal, Michel; Moreau, Philippe; Charbonnel, Catherine; Garban, Frédéric; Hulin, Cyrille et al. (2007): Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. In: *Blood* 109 (8), S. 3489–3495. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2006-08-040410.
- Avet-Loiseau, Hervé; Leleu, Xavier; Roussel, Murielle; Moreau, Philippe; Guerin-Charbonnel, Catherine; Caillot, Denis et al. (2010): Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). In: *J. Clin. Oncol.* 28 (30), S. 4630–4634.
- Bacher, Ulrike; Haferlach, Torsten; Kern, Wolfgang; Alpermann, Tamara; Schnittger, Susanne; Haferlach, Claudia (2010): Correlation of cytomorphology, immunophenotyping, and interphase fluorescence in situ hybridization in 381 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 301 patients with plasma cell myeloma. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 203 (2), S. 169–175.
- Bataille, Régis; Jégo, Gaëtan; Robillard, Nelly; Barillé-Nion, Sophie; Harousseau, Jean-Luc; Moreau, Philippe et al. (2006): The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. In: *Haematologica* 91 (9), S. 1234–1240.
- Bergsagel, P. Leif; Kuehl, W. Michael (2005): Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. In: *J. Clin. Oncol.* 23 (26), S. 6333–6338.
- Billadeau, D.; Quam, L.; Thomas, W.; Kay, N.; Greipp, P.; Kyle, R. et al. (1992): Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. In: *Blood* 80 (7), S. 1818–1824.
- Butler, Charles; Wolff, Daynna J.; Kang, Yubin; Stuart, Robert K.; Costa, Luciano J. (2012): Association of age with fluorescence in situ hybridization abnormalities in multiple myeloma reveals higher rate of IGH translocations among older patients. In: *Leuk Lymphoma* 53 (12), S. 2444–2448.

- Cao, Wenqing; Goolsby, Charles L.; Nelson, Beverly P.; Singhal, Seema; Mehta, Jayesh; Peterson, Loann C. (2008): Instability of immunophenotype in plasma cell myeloma. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 129 (6), S. 926–933.
- Chalmers, J. J.; Zborowski, M.; Sun, L.; Moore, L.: Flow through, immunomagnetic cell separation. In: *Biotechnol. Prog.* 14 (1), S. 141–148.
- Chapman, Michael A.; Lawrence, Michael S.; Keats, Jonathan J.; Cibulskis, Kristian; Sougnez, Carrie; Schinzel, Anna C. et al. (2011): Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. In: *Nature* 471 (7339), S. 467–472.
- Chen, K. C.; Bevan, P. C.; Matthews, J. G. (1986): Analysis of G banded karyotypes in myeloma cells. In: *J. Clin. Pathol.* 39 (3), S. 260–266.
- Chen, L-J; Li, J-Y; Xu, W.; Qiu, H-R; Zhu, Y.; Zhang, Y-P et al. (2007): Molecular cytogenetic aberrations in patients with multiple myeloma studied by interphase fluorescence in situ hybridization. In: *Exp. Oncol.* 29 (2), S. 116–120.
- Chen, Zhong; Issa, Bonnie; Huang, Shiang; Aston, Emily; Xu, Jia; Yu, Margaret et al. (2005): A practical approach to the detection of prognostically significant genomic aberrations in multiple myeloma. In: *J Mol Diagn* 7 (5), S. 560–565.
- Claussen, U.; Michel, S.; Mühlig, P.; Westermann, M.; Grummt, U.-W et al. (2002): Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis. In: *Cytogenet Genome Res* 98 (2-3), S. 136–146, zuletzt geprüft am 19.12.2012.
- Cumova, Jana; Kovarova, L.; Potacova, A.; Buresova, I.; Kryukov, F.; Penka, M. et al. (2010): Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. In: *Int. J. Hematol.* 92 (2), S. 314–319.
- Deng, Wen; Tsao, Sai Wah; Lucas, Joe N.; Leung, C. S.; Cheung, Annie L. M. (2003): A new method for improving metaphase chromosome spreading. In: *Cytometry* 51 (1), S. 46–51,
- Dewald, G. W.; Broderick, D. J.; Tom, W. W.; Hagstrom, J. E.; Pierre, R. V. (1985a): The efficacy of direct, 24-hour culture, and mitotic synchronization methods for cytogenetic analysis of bone marrow in neoplastic hematologic disorders. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 18 (1), S. 1–10.
- Dewald, G. W.; Kyle, R. A.; Hicks, G. A.; Greipp, P. R. (1985b): The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. In: *Blood* 66 (2), S. 380–390.
- Dewald, Gordon W.; Therneau, Terry; Larson, Dirk; Lee, You Kyoung; Fink, Stephanie; Smoley, Stephanie et al. (2005): Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma. In: *Blood* 106 (10), S. 3553–3558.
- Drach, J.; Schuster, J.; Nowotny, H.; Angerler, J.; Rosenthal, F.; Fiegl, M. et al. (1995): Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. In: *Cancer Res.* 55 (17), S. 3854–3859.
- Durie, B. G.; Salmon, S. E. (1975): A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. In: *Cancer* 36 (3), S. 842–854.

- Fonseca, R.; Bergsagel, P. L.; Drach, J.; Shaughnessy, J.; Gutierrez, N.; Stewart, K. et al. (2009): International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. In: *Leukemia*.
- Fonseca, Rafael; Barlogie, Bart; Bataille, Regis; Bastard, Christian; Bergsagel, P. Leif; Chesi, Marta et al. (2004): Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. In: *Cancer Res.* 64 (4), S. 1546–1558.
- Goldschmidt, Hartmut; Cremer, Friedrich W. (2002): Das multiple Myelom (Plasmozytom) /// Das Multiple Myelom (Plasmozytom). Diagnose und Therapie. 1. Aufl. Bremen u.a. /// Bremen: UNI-MED-Verl. (UNI-MED science).
- Greipp, Philip R.; San Miguel, Jesus; Durie, Brian G. M.; Crowley, John J.; Barlogie, Bart; Bladé, Joan et al. (2005): International staging system for multiple myeloma. In: *J. Clin. Oncol.* 23 (15), S. 3412–3420.
- Hartmann, L.; Biggerstaff, J. S.; Chapman, D. B.; Scott, J. M.; Johnson, K. R.; Ghirardelli, K. M. et al. (2011): Detection of Genomic Abnormalities in Multiple Myeloma: The Application of FISH Analysis in Combination With Various Plasma Cell Enrichment Techniques. In: *American Journal of Clinical Pathology* 136 (5), S. 712–720.
- Hawkins, J. M.; Secker-Walker, L. M. (1991): Evaluation of cytogenetic samples and pertinent technical variables in adult acute lymphocytic leukemia. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 52 (1), S. 79–84.
- Hideshima, Teru; Mitsiades, Constantine; Tonon, Giovanni; Richardson, Paul G.; Anderson, Kenneth C. (2007): Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. In: *Nat. Rev. Cancer* 7 (8), S. 585–598.
- Hliscs, R.; Mühlig, P.; Claussen, U. (1997): The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. In: *Cytogenet. Cell Genet.* 76 (3-4), S. 167–171.
- Hussein, Kebede; Ketterling, Rhett P.; Hulshizer, Rachael L.; Kuffel, Daniel G.; Wiktor, Anne E.; Hanson, Curtis A. et al. (2008): Peripheral blood cytogenetic studies in hematological neoplasms: predictors of obtaining metaphases for analysis. In: *Eur. J. Haematol.* 80 (4), S. 318–321.
- Jagannath, S.; Richardson, P. G.; Sonneveld, P.; Schuster, M. W.; Irwin, D.; Stadtmauer, E. A. et al. (2007): Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. In: *Leukemia* 21 (1), S. 151–157.
- Jagannath, Sundar (2008): Pathophysiological underpinnings of multiple myeloma progression. In: *J Manag Care Pharm* 14 (7 Suppl), S. 7–11.
- Jourdan, M.; Ferlin, M.; Legouffe, E.; Horvathova, M.; Liautard, J.; Rossi, J. F. et al. (1998): The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. In: *Br. J. Haematol.* 100 (4), S. 637–646.
- Kaufmann, Hannes; Krömer, Elisabeth; Nösslinger, Thomas; Weltermann, Ansgar; Ackermann, Jutta; Reisner, Regina et al. (2003): Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma. In: *Eur. J. Haematol.* 71 (3), S. 179–183.

- Kekarainen, Tuija; Mannelin, Sirkka; Laine, Jarmo; Jaatinen, Taina (2006): Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. In: *BMC Cell Biol.* 7, S. 30.
- Kline, M. P.; Rajkumar, S. V.; Timm, M. M.; Kimlinger, T. K.; Haug, J. L.; Lust, J. A. et al. (2007): ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells. In: *Leukemia* 21 (7), S. 1549–1560.
- Kumar, Ashok; Galaev, Igor Yu; Mattiasson, Bo (2007): Cell Separation. Fundamentals, Analytical and Preparative Methods. Dordrecht: Springer.
- Kumar, Shaji; Kimlinger, Teresa; Morice, William (2010): Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. In: *Best Pract Res Clin Haematol* 23 (3), S. 433–451.
- Kyle, Robert A.; Gertz, Morie A.; Witzig, Thomas E.; Lust, John A.; Lacy, Martha Q.; Dispenzieri, Angela et al. (2003): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. In: *Mayo Clin. Proc.* 78 (1), S. 21–33.
- Largo, Cristina; Saéz, Borja; Alvarez, Sara; Suela, Javier; Ferreira, Bibiana; Blesa, David et al. (2007): Multiple myeloma primary cells show a highly rearranged unbalanced genome with amplifications and homozygous deletions irrespective of the presence of immunoglobulin-related chromosome translocations. In: *Haematologica* 92 (6), S. 795–802.
- Lin, Pei (2009): Plasma cell myeloma. In: *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 23 (4), S. 709–727.
- McFee, A. F.; Sayer, A. M.; Salomaa, S. I.; Lindholm, C.; Littlefield, L. G. (1997): Methods for improving the yield and quality of metaphase preparations for FISH probing of human lymphocyte chromosomes. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 29 (1), S. 98–104.
- Mohamed, Anwar N.; Bentley, Gail; Bonnett, Michelle L.; Zonder, Jeff; Al-Katib, Ayad (2007): Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. In: *Am. J. Hematol.* 82 (12), S. 1080–1087.
- Munshi, Nikhil C. (2008): Investigative tools for diagnosis and management. In: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, S. 298–305.
- Nilsson, T.; Lenhoff, S.; Turesson, I.; Rylander, L.; Mitelman, F.; Westin, J. et al. (2002): Cytogenetic features of multiple myeloma: impact of gender, age, disease phase, culture time, and cytokine stimulation. In: *Eur. J. Haematol.* 68 (6), S. 345–353.
- Nilsson, Therese; Lenhoff, Stig; Rylander, Lars; Höglund, Mattias; Turesson, Ingemar; Mitelman, Felix et al. (2004): High frequencies of chromosomal aberrations in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance in direct chromosome preparation. In: *Br. J. Haematol.* 126 (4), S. 487–494.
- Ocio, E. M.; Richardson, P. G.; Rajkumar, S. V.; Palumbo, A.; Mateos, M. V.; Orłowski, R. et al. (2014): New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). In: *Leukemia* 28 (3), S. 525–542. DOI: 10.1038/leu.2013.350.
- Ortega, Veronica; Mohamed, Gihan; Ehman, William; Zhu, Meiqing; Mendiola, Christina; Velagaleti, Gopalrao (2016): Optimal strategy for obtaining routine

- chromosome analysis by using negative fractions of CD138 enriched plasma cells. In: *Cancer genetics* 209 (3), S. 82–86. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.12.008.
- Palumbo, Antonio; Avet-Loiseau, Hervé; Oliva, Stefania; Lokhorst, Henk M.; Goldschmidt, Hartmut; Rosinol, Laura et al. (2015): Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (26), S. 2863–2869. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2267.
- Pantou, Dimitra; Rizou, Helen; Tsarouha, Haroula; Pouli, Anastasia; Papanastasiou, Kostas; Stamatellou, Marina et al. (2005): Cytogenetic manifestations of multiple myeloma heterogeneity. In: *Genes Chromosomes Cancer* 42 (1), S. 44–57.
- Pratt, G. (2002): Molecular aspects of multiple myeloma. In: *MP, Mol. Pathol.* 55 (5), S. 273–283.
- Radbruch, Andreas (2000): Flow cytometry and cell sorting. 2. ed. Berlin u.a. // Berlin: Springer (Springer lab manual).
- Rajkumar, S. Vincent; Dimopoulos, Meletios A.; Palumbo, Antonio; Blade, Joan; Merlini, Giampaolo; Mateos, María-Victoria et al. (2014): International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. In: *The Lancet Oncology* 15 (12), S. e538–e548. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- Rieder, Harald; Bachmann, Ina; Busch, Sylke; Schwartz, Stefan; Reckzeh, Barbara; Hoelzer, Dieter (2003): Cell lineage assignment of cytogenetic findings in acute lymphoblastic leukemia using combined immunomagnetic cell separation and chromosome preparation. In: *Haematologica* 88 (11), S. 1317–1320.
- Ross, F. M.; Avet-Loiseau, H.; Ameye, G.; Gutierrez, N. C.; Liebisch, P.; O'Connor, S. et al. (2012): Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. In: *Haematologica* 97 (8), S. 1272–1277,
- San Miguel, Jesús F.; Gutiérrez, Norma C.; Mateo, Gema; Orfao, Alberto (2006): Conventional diagnostics in multiple myeloma. In: *Eur. J. Cancer* 42 (11), S. 1510–1519.
- Sanderson, R. D.; Børset, M. (2002): Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. In: *Ann. Hematol.* 81 (3), S. 125–135.
- Sawyer, J. R.; Waldron, J. A.; Jagannath, S.; Barlogie, B. (1995): Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 82 (1), S. 41–49.
- Schroers, R.; Zettl, F.; Jung, W. (2005): Multiples Myelom - Diagnostik. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift* 130 (06), S. 278–282.
- Shaffer, Lisa G.; Slovak, Marilyn L.; Campbell, Lynda J. (2009): ISCN 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature (2009). Basel ;, Unionville, CT: Karger.
- Usmani, S. Z.; Rodriguez-Otero, P.; Bhutani, M.; Mateos, M-V; Miguel, J. S. (2015): Defining and treating high-risk multiple myeloma. In: *Leukemia* 29 (11), S. 2119–2125. DOI: 10.1038/leu.2015.209.

- Webber, L. M.; Garson, O. M. (1983): The influence of colcemid concentration on mitotic index and length of bone marrow chromosomes. In: *Pathology* 15 (3), S. 305–308.
- Wegner, Rolf-Dieter (1999): Diagnostic cytogenetics. Berlin u.a. /// Berlin: Springer (Springer lab manual).
- Weh, H. J.; Gutensohn, K.; Selbach, J.; Kruse, R.; Wacker-Backhaus, G.; Seeger, D. et al. (1993): Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukaemia. In: *Eur. J. Cancer* 29A (9), S. 1269–1273.
- Wiktor, Anne; van Dyke, Daniel L. (2004): Combined cytogenetic testing and fluorescence in situ hybridization analysis in the study of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 153 (1), S. 73–76.
- Wynter, E. A. de; Ryder, D.; Lanza, F.; Nadali, G.; Johnsen, H.; Denning-Kendall, P. et al. (1999): Multicentre European study comparing selection techniques for the isolation of CD34+ cells. In: *Bone Marrow Transplant.* 23 (11), S. 1191–1196.
- Yunis, J. J. (1976): High resolution of human chromosomes. In: *Science* 191 (4233), S. 1268–1270.
- Yunis, J. J. (1981): New chromosome techniques in the study of human neoplasia. In: *Hum. Pathol.* 12 (6), S. 540–549.
- Zborowski, Maciej (2008): Magnetic cell separation. 1. ed. Amsterdam u.a. /// Amsterdam /// Amsterdam u.a.: Elsevier (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, 32).
- Zlei, Mihaela; Egert, Sabine; Wider, Dagmar; Ihorst, Gabriele; Wäsch, Ralph; Engelhardt, Monika (2007): Characterization of in vitro growth of multiple myeloma cells. In: *Exp. Hematol.* 35 (10), S. 1550–1561.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

14.06.2016, Verena Giesen