

Aus der Abteilung Onkologie und Hämatologie,
Einrichtung für Knochenmarktransplantation
der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
der Universität Hamburg
Leiter: Prof. Dr. med. A. Zander

**Entdeckung von minimaler Restkrankheit
in Blut und Knochenmark bei malignen Lymphomerkrankungen
durch Kombination von
in-vitro-Kultivierung und molekulargenetischer Analyse**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin der
Universität Hamburg vorgelegt von
KORFF KRAUSE
aus Hamburg

Hamburg 2000

Annahmevermerk

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: *18. Juni 2001*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: *Prof. Dr. H.-P. Gleichmann*

Referent: *Prof. Dr. A.R. Zander*

Korreferent: _____

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Minimale Restkrankheit	1
1.2 Epidemiologie und klinische Charakterisierung von Leukämien und Lymphomen	1
1.3 Einteilung von Leukämien und Lymphom-Erkrankungen	3
4.1 Molekularbiologische Charakterisierung von Lymphomen und Leukämien	5
1.5. Molekulargenetische Nachweisverfahren von Klonalität bei Lymphomen und Leukämien	6
1.5.1 DNS-Filterhybridisierung	6
1.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	7
1.6 Grundlage der Immunologie der Antikörperbildung	8
1.6.1 Rearrangement bei der Immunglobulin-Synthese	9
1.6.2 T-Zell-Rezeptor-Synthese	11
1.7 Therapie von Leukämie- und Lymphom-Erkrankungen	13
1.7.1 Stammzelltransplantation	14
1.7.2 Donor-Lymphozyten Gabe	15
2. Zielsetzung und experimentelles Design	16
3. Material und Methoden	18
3.1 Geräte	18
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	19
3.3 Tumorzell-Linien	19
3.4 Isolierung mononukleärer Leukozyten	20
3.5 Knochenmark-Langzeitflüssigkultur	20
3.6 Zytospinpräparate und Färbung nach Pappenheim	21
3.7 Agarosegelelektrophorese von DNS	21
3.8 Isolierung genomischer DNS	22

3.9 Restriktionsenzymatische DNS-Fragmentierung	24
3.10 Isolierung kleiner Mengen Plasmid DNS	25
3.11 Plasmid isolierung im Anionen-Austausch Verfahren	26
3.12 DNS-Extraktion aus Agarosegelen	27
3.13 Anzucht klonierter Bakterienstämme	28
3.14 Beschreibung der verwendeten Gen-Sonden	29
3.15 DNS-Blot auf Nylon-Membranfilter	31
3.16 DNS-Markierung mit radioaktivem Phosphat	32
3.17 DNS-Hybridisierung	33
3.18 Autoradiographie	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Etablierung eines Assays aus Langzeitflüssigkultur und DNS-Filterhybridisierung zum Nachweis von minimaler Restkrankheit	35
4.1.1 Sensitivität der DNS-Filterhybridisierung zum Nachweis von Monoklonalität	35
4.1.2 Sensitivität des lichtmikroskopischen Nachweises von Burkitt-Lymphomzellen in normalen mononukleären KM Zellen	37
4.1.3 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Burkitt-Lymphom-Zellen (Zelllinie Raji) der B-Reihe und gesunden mononukleären KM-Zellen	37
4.1.4 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Burkitt-Lymphom-Zellen der B-Reihe (Zelllinie ST486) und gesunden mononukleären KM-Zellen	40
4.1.5 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Lymphom-Zellen der T-Reihe (Zelllinie Molt3) und gesunden mononukleären KM-Zellen	44
4.2 Ergebnisse des Assays zum Nachweis von minimaler Restkrankheit nach klinischer Anwendung	48
4.2.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten	48
4.2.2 Nachweis von minimaler Restkrankheit bei den untersuchten Patienten	50
4.2.3 Korrelation der Testergebnisse mit dem klinischem Verlauf	50
4.2.4 Prädiktiv-Werte des Assays	55

4.2.6 Sensitivität und Spezifität des Assays	56
4.2.7 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier	56
5. Diskussion	58
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	70
Danksagungen	90
Lebenslauf	91
Erklärung	92

Abkürzungen

ALL:	Akute lymphatische Leukämie
CD:	Cluster of Differentiation
cDNS:	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR:	Complementary Determining Region
DNS:	Desoxyribonukleinsäure
EBV:	Epstein-Barr-Virus
GvHD:	Spender versus Empfänger Reaktion
HLA:	Humanes Leukozyten-Antigen
HTLV:	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
Ig:	Immunglobulin
Kb:	Kilobasen
Kd:	Kilodalton
KM:	Knochenmark
KMT:	Knochenmarktransplantation
LB:	Luria Bertani Medium
LP:	Leukapherese
mRNS:	Boten-Ribonukleinsäure
NHL:	Non-Hodgkin-Lymphom
OD:	Optische Dichte
PBSC:	Periphere Stammzell-Kollektion
PCR:	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNS:	Ribonukleinsäure
RT PCR:	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS:	Natriumlaurylsulfat
TZR:	T-Zell-Rezeptor
UV:	Ultraviolett
VDJ:	Variabilitäts-, Diversitäts-, Verbindungsregion der Immunglobuline

1. Einleitung

1.1 Minimale Restkrankheit

Bei Leukämie-Patienten kann die Tumorlast 10^{10} bis 10^{12} maligne Zellen betragen. Wenn keine klinischen Zeichen sowie weniger als 5% Tumorzellen morphologisch im Knochenmark nachweisbar sind, besteht nach der klinischen Einteilung eine Vollremission der Erkrankung. Dabei können aber weiterhin bis zu 10^8 oder 10^{10} Tumorzellen vorhanden sein (Schäfer 1989). Allein morphologisch-mikroskopische Untersuchungen, auch unter Anwendung der Immunhistochemie, können einen neoplastischen Zellanteil nicht unterhalb von 1% der Zellpopulation sicher entdecken (Janossy et al. 1988). So wird also in der bisherigen klinischen Einteilung bei einem Patienten in Vollremission nicht unterschieden zwischen Patienten ohne Tumorzellen und solchen mit minimaler Restkrankheit, wobei diese auch ein unterschiedliches Maß an Tumorlast bedeuten kann. Dabei würden sich gerade in der Therapie, v.a. hinsichtlich einer Knochenmarkstransplantation (KMT), große Unterschiede ergeben, wäre eine weitere Diskriminierung der Tumorlast möglich. Darüberhinaus besteht bekanntermaßen ein enger Zusammenhang zwischen der Größe der Tumorlast und der Heilbarkeit bzw. der Prognose der Lymphomkrankung (Pratt et al. 1994) sowie der Entwicklung von Chemotherapeutika-Resistenzen (multiple drug resistance, MDR) (Arceci 1993). Eine größere Sensitivität in der Entdeckung maligner Zellen in Knochenmark und Blut würde die Behandlungsstrategie daher entscheidend mitbeeinflussen.

1.2 Epidemiologie und klinische Charakterisierung von Leukämien und Lymphomen

Die Inzidenz von akuten lymphatischen Leukämien in Europa beträgt 3,2 (Männer) bzw. 4,5 (Frauen) pro 100 000, die von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) 8,2 (Männer) bzw. 4,5 (Frauen) pro 100 000 Einwohner.

Die Ursachen von Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen sind nicht eindeutig geklärt. Ätiologische Faktoren, die bei der Entstehung eine Rolle spielen können sind: ionisierende Strahlen, bestimmte Chemotherapeutika (z.B. Alkylantien) oder chemisch-toxische Stoffe wie Benzol, Viren (HTLV I-Nachweis bei T-Zell Lymphomen sowie EBV beim endemischen Burkitt-Lymphom), kongenitale Erkrankungen wie das Down Syndrom oder die Fanconi Anämie (Toledano 1980) und genetische Faktoren. Die Ätiologie ist letztlich nicht endgültig geklärt.

Klinisch manifestieren sich lymphoide Erkrankungen durch Lymphknotenschwellungen, Leber- und Milzvergrößerung und Zeichen der Verdrängung der regulären Hämatopoese im Knochenmark: Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust werden als B-Symptome bezeichnet.

Die klinische Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgt nach Ann Arbor (Carbone et al. 1971) und ist Tab. 1.1 wiedergegeben.

Tab.1.1

Stadium	Tumorbefall
I	Eine Lymphknotenregion oder ein lokalisiertes extralymphatisches Gewebe/Organ (E)
II	Zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf der selben Seite des Zwerchfells oder eine Lymphknotenregion plus ein lokalisiertes extralymphatisches Gewebe/Organ
III	Lymphknoten auf beiden Seiten des Zwerchfells plus ein lokalisiertes extralymphatisches Gewebe/Organ oder/und Milz (S)
IV	Diffuse Infiltration von extra-lymphatischem Gewebe mit Lymphknotenregionen

1.3 Einteilung von Leukämien und Lymphom-Erkrankungen

Leukämien und Lymphome sind heterogene Erkrankungen mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen Entitäten und Verläufen. Unter einer Leukämie, einem von Rudolf Virchow geprägten Begriff, versteht man eine klonale Proliferation aus der leukozytären Reihe der Hämpoese, die mit einer variabel ausgeprägten Zellausschwemmung in das periphere Blut einhergeht. Entsprechend der Subklassifikation von Leukozyten in myeloisches und lymphatisches System unterscheidet man myeloische und lymphatische Leukämien. Der Reifungsgrad der proliferierenden Zellen bestimmt die Einteilung in akute und chronische Leukämien. Bei der akuten Leukämie kommt es zu einem Sistieren der Ausreifung leukämischer Blasten bei gleichzeitigem Erhalt ihrer Teilungsfähigkeit. Anhäufung ausdifferenzierter, reifer Zellklone findet man bei den chronischen Leukämien.

Maligne Lymphome werden unterteilt in Hodgkin-Lymphome (Lymphogranulomatose), eine bösartige Erkrankung des lymphoretikulären Gewebes mit feingeweblichem Nachweis von Blasten (Hodgkin-Zellen), mehrkernigen Riesenzellen (Sternbergsche Riesenzellen) und Granulationsgewebe, sowie Non-Hodgkin Lymphome (NHL). Unter den Non-Hodgkin-Lymphomen werden alle malignen Lymphknotentumoren zusammengefaßt, die sich von Zellen des lymphatischen Gewebes herleiten. Hierunter lassen sich auch die lymphatischen Leukämien subsummieren. Die Einteilung der NHL erfolgte in Deutschland zuletzt überwiegend nach der Kieler Klassifikation (Tab.1.2, S.4), die von der Hypothese ausgeht, dass die Lymphome sich von bestimmten Reifungsstadien der regulären Lymphopoese herleiten (Lennert 1981).

Tab. 1.2. Kiel-Klassifikation der malignen Non-Hodgkin-Lymphome

Niedrigmaligne Lymphome	Lymphozytische Lymphome (u.a. B- und T-CLL), Lymphoplasmozytische/-zytoide Lymphome, Plasmazytische Lymphome Zentroblastisch/zentrozytische Lymphome
Intermediärmaligne Lymphome	Zentrozytische Lymphome
Hochmaligne Lymphome	Zentroblastische Lymphome
Lymphome	Lymphoblastische Lymphome (u.a. B- und T-ALL) Immunoblastische Lymphome

Da vornehmlich in den angelsächsischen Ländern andere Lymphom-Klassifikationen gebraucht wurden, kam es seit 1994 zu einem transatlantischen Konsensus in der sogenannten R.E.A.L.-Klassifikation (revised European/ American lymphoma classification). Hierbei werden die Lymphome als Entitäten eingeteilt, innerhalb derer verschiedene histologische Graduierungen und verschiedene klinische Aggressivitäten beobachtet werden können. Dieser Ansatz berücksichtigt Morphologie, Immunphänotyp, genetische Veränderungen und klinisches Erscheinungsbild in variierender Ausprägung. Ziel ist es, Krankheits-Entitäten zu definieren, die der Pathologe beschreibt und die darüberhinaus im klinischen Verhalten als eigenständige Krankheit imponieren. Seit 1995 arbeiten Gruppen amerikanischer und europäischer Pathologen für die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) an einer Klassifikation hämatologischer Neoplasien, bei der eine aktualisierte Version der R.E.A.L.-Klassifikation Verwendung findet (Muller-Hermelink 1999; Harris et al. 2000).

1.4 Molekularbiologische Charakterisierung von Lymphomen und Leukämien

Entscheidenden Fortschritt für das Verstehen normaler lympho-hämatopoetischer Zelldifferenzierung brachte die Entwicklung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein 1975). Lymphatische Zellen exprimieren während ihrer Reifung verschiedene antigene Eigenschaften, die mit spezifischen Antikörpern gegen zytoplasmatische und Membranoberflächen-Proteine erkannt werden können. In erster Linie werden CD (cluster differentiation)-Antikörper gegen menschlich Leukozytenantigene verwendet. Diese Immunphänotypisierung dient vor allem auch der Unterscheidung von malignen und benignen Erkrankungen sowie der Klassifikation neoplastischer lymphoider Zellen hinsichtlich ihrer Zell-Linien-Zugehörigkeit, Genaktivität und ihrem Differenzierungsgrad (Foon und Todd 1986, Korsmeyer et al. 1983, Knowles et al. 1989). Ein Nachteil bei der Verwendung immunologischer Marker in der Lymphom- und Leukämie-Diagnostik ist neben der Tatsache, dass die Immunphänotypisierung nicht malignitätsspezifisch ist, das Fehlen der Antigen-Expression in unreifen lymphoiden Tumoren.

Zahlreiche genetische Abnormalitäten, vor allem in Form chromosomaler Translokationen, sind für Leukämien und Lymphome beschrieben. Der erstmalige Nachweis dieser Translokationen gelang über die Karyotyp-Analyse, bei der gezeigt werden konnte, dass einige NHL assoziiert sind mit der Verlagerung zellulärer Onkogene von ihren Chromosomabschnitten auf Regionen, die Antigenrezeptoren kodieren (Yunis et al. 1982, Dalla-Favera et al. 1982, Croce and Nowell 1985). Zelluläre Onkogene sind Gensequenzen in normalen Zellen, die Homologien aufweisen mit viralen, Tumorstadium induzierenden Onkogenen (Bishop 1985). Die Konversion von Proto-Onkogenen zu Onkogenen mit aktiviertem transformierendem Potential, kann verursacht werden durch Punktmutationen, Gen-Amplifikationen, chromosomale Translokationen und andere Mechanismen, die eine Deregulation der Onkogene herbeiführen. Auch bei malignen Lymphomen finden sich derartige genetische Veränderungen:

die Mehrzahl aller zentroblastisch-zentrozytischen (follikulären) Lymphome trägt eine Translokation des Proto-Onkogens bcl-2, eines an dem Apoptose-Prozess beteiligten

Onkogens, von Chromosom 18 auf Chromosom 14, lokalisiert in der JH-Region des IgH-Gens (Yunis et al. 1982 und 1987, Crescenci et al. 1985, Tsujimoto et al. 1987).

Ein weiteres prominentes Beispiel für chromosomale Translokation in menschliche hämatopoetischen Neoplasien ist das Burkitt-Lymphom, eine Form der akute lymphatischen Leukämie. Drei Formen von Translokationen sind hier beschrieben worden: t(8;14), t(2;8) und t(2;22). Bei allen diesen Rearrangements wird das c-myc Proto-Onkogen in die IgH-oder IgL-Genregion tranloziert (Zech et al. 1976, Dalla-Favera 1982, Taub et al. 1982, Croce et al. 1983). Das c-myc Onkogen-Genprodukt ist intranukleär gelegen und fähig, DNS zu binden (Abrams et al. 1982). Die genaue Funktion dieses Proteins ist immer noch unklar.

B-Zell-Lymphome (B- NHL) sind klonale Neoplasien, die für jeden Zellklon spezifische monoklonale Rearrangements aus der Immunglobulingen-Keimbahn bilden. Im Gegensatz hierzu findet in der natürlichen B-Zell-Ontogenese eine Rekombination von Immunglobulin-Schwerketten und Leichtketten statt, die für jede individuelle B-Zelle singuläre und spezifische Antikörper kodiert. Daraus resultiert eine polyklonale B-Zell-Population mit zahlreichen, unterschiedlichen Immuglobulingen-Rearrangements.

1.5. Molekulargenetische Nachweisverfahren von Klonalität bei Lymphomen und Leukämien

1.5.1 DNS-Filterhybridisierung

Monoklonale Rearrangements bei lymphatischen Neoplasien wurden primär durch die DNS-Filterhybridisierung nach Southern nachgewiesen (Southern 1975). Polyklonale Zellpopulationen weisen nach restriktionsenzymatischer Verdauung ihrer DNS multiple unterschiedlich große Immunglobulin-Gen-haltige DNS-Fragmente auf, die unter der Nachweisgrenze liegen, so dass allein die Keimbahnkonfiguration markiert werden kann. Die Markierung erfolgt durch eine Hybridisierung mit einem komplementären DNS-Fragment, das für eine bestimmte Ig-Genregion kodiert. Konträr hierzu läßt sich eine monoklonale Expansion daran erkennen, dass zahlreiche Kopien einer einzigen im

elektrischem Feld aufgetrennten DNS-Fragmentgröße in Form einer Bande nachweisbar ist, die nicht der Keimbahnkonfiguration entspricht (Arnold et al. 1983, Flug et al. 1985, Waldmann et al. 1987, Korsmeyer et al. 1983, Knowles et al. 1987, Wright et al. 1987). Die molekulargenetische Analyse dieser monoklonalen Rearrangements kann wertvoll sein bei Diagnose und Klassifikation, Monitoring des Therapieverlaufes und Entdeckung minimaler Metastasen von Leukämien und Lymphomen.

1.5.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Seit der Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch Mullis und Saiki (Mullis 1987, Saiki 1988), bei der bestimmte Gensequenzen mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase amplifiziert werden, steht eine weitere Methode zur Verfügung, mit der Monoklonalität bei Leukämien und Lymphomen auf der molekulargenetischen Ebene nachgewiesen werden kann. Hierbei werden Gen-Sequenzen amplifiziert, die von der Immunglobulin-Schwerkettengenregion (IgH) und der hypervariablen CDR3-Region flankiert werden. Bei Monoklonalität wird ein Genfragment als Bande bestimmter Größe nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbar. Bei Polyklonalität entstehen entweder zahlreiche, kaum trennbare Banden oder gar keine, weil ein Amplifikat zu groß für die Polymerase-Ketten-Reaktion ist. (Yamada et al. 1989, Deane und Norton 1990, McCarthy et al. 1990, Hansen-Hagge et al. 1989).

Analog dem Ig-Gen Rearrangement bei B-Zell-Neoplasien dient der molekulargenetische Nachweis eines monoklonalen T-Zellrezeptor (TZR)-Betaketten oder Gammaketten-Gen-Rearrangements als diagnostischer Marker für die T-Zell-Leukämien und Lymphome (Aisenberg et al. 1985, Bertness et al. 1985; Tycko et al. 1989).

Über das DNS-Filterhybridisierungsverfahren (Southern-Blot) oder PCR-Verfahren nachgewiesene Ig- und TZR-Gen Rearrangements können so als Zeichen für Monoklonalität und damit sowohl als diagnostisches Kriterium für lymphoide Neoplasien, als auch für die Einteilung in deren B-oder T-Zell-Linienzugehörigkeit Verwendung finden.

Letzteres erweist sich vor allem wertvoll bei unreifzelligen Leukämien, die keine Immunphänotypisierung erlauben (Arnold et al. 1983, Korsmeyer et al. 1983, Cleary et al. 1984).

Dennoch können Southern-Blot-oder PCR-Analysen nicht in allen Fällen ausreichend für die Bewertung der Zell-Linienzugehörigkeit sein. So wurden simultane IgH und TZR Gen-Rearrangements (Pelicci 1985, Greaves 1986, Tawa 1986), als auch IgH Gen Rearrangements in Leukämien vom myeloischem Typ beschrieben (Rovigatti 1984, Cheng 1986, Palumbo 1984). Auch kommen TZR beta Genrearrangements in Leukämien vom B-Zell Phänotyp vor (Tawa 1985, Felix 1987, Goorha 1987).

1.6 Grundlage der Immunologie der Antikörperbildung

Das menschliche Immunsystem kann unterteilt werden in angeborene und erworbene (oder spezifische) Immunität. Beide Abwehrmechanismen können auf Antigene mit einer zellulären und einer humoralen Immunantwort reagieren (Tab 1.3). Bestandteil der spezifischen humoralen Abwehr sind durch Plasmazellen sezernierte Antikörper. Plasmazellen gehen durch einen Differenzierungsprozess aus Knochenmark-Stammzellen hervor. Die im Thymus gereifte Lymphozyten-Subpopulation der T-Zellen stellt die spezifische zelluläre Immunantwort dar.

Tab. 1.3. Einteilung der Immunität (nach Roitt 1987)

	angeboren	erworben
humoral	Lysozym Komplementsystem	Antikörper
zellulär	Akutphaseproteine Makrophagen, natürliche Killerzellen	T-Lymphozyten

Voraussetzung für das Erkennen und Unterscheiden einer nahezu unbegrenzten Anzahl verschiedener Antigene ist eine enorm große Vielfalt der Antigen-Rezeptoren auf der Oberfläche reifer T- und B-Zellen. Mit Hilfe rasch fortschreitender rekombinanter DNS-Technologien konnte gezeigt werden, dass der Immunglobulin (Ig)- und T-Zellrezeptor (TZR) Variabilität eine Rekombination und Mutation der begrenzten Anzahl kodierender Gene zugrunde liegt (Hozumi et al. 1976, Sakano et al. 1980, Leder 1982, Tonegawa 1983, Hedrick et al. 1984, Yanagi et al. 1984). In Verbindung mit diesen Ergebnissen gelang der Nachweis monoklonaler Ig- und TZR-Gen Rearrangements bei menschlichen lymphoiden Neoplasien.

1.6.1 Rearrangement bei der Immunglobulin-Synthese

Das Basismolekül eines Immunglobulins (Ig) besteht aus zwei identischen 25 Kd großen, leichten (L) und zwei identischen, schweren (H) Ketten (55 Kd), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Durch Papain-Spaltung erhält man ein Fc-Fragment, das Lymphozyten, Makrophagen und Komplement binden kann, sowie zwei Fab-Fragmente (ab = antigenbindend), die Antigene präzipitieren (Edelmann 1973, Davies et al. 1975). Sowohl L-Ketten, als auch H-Ketten besitzen variable (V) und konstante (C) Domänen. Die variablen Regionen befinden sich an den amino-terminalen Enden der Fab-Fragmente und weisen unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf, die die selektive Reaktionsfähigkeit gegenüber Antigenen bedingen. Innerhalb dieser variablen Abschnitte der H- und L-Ketten entdeckten Kabat und Wu drei hochvariable Subregionen, complementarity-determining regions (CDR 1, CDR 2, CDR 3), die von vier weniger variablen Rahmenregionen, framework regions (FR 1, FR 2, FR 3, FR 4), flankiert werden (Wu und Kabat 1970). Es existieren zwei Typen von L-Ketten: κ und λ im Verhältnis 60: 40 beim Menschen. Die H-Ketten charakterisieren fünf Klassen von Immunglobulinen: das Pentamer IgM (μ -Kette), das Dimer IgA (α -Kette), die Monomere IgE (ϵ -Kette), IgD (δ -Kette) und IgG (γ -Ketten). Von der γ -Kette existieren vier Subklassen (Marcu et al. 1982). Die Immunglobulin-Klassen unterscheiden sich durch ihre distinkten biologischen Funktionen.

Aufgrund der hohen Variabilität in der amino-terminalen Ig-Hälfte und der nahezu konstanten carboxy-terminalen Region von L-Ketten, kamen Dreyer und Bennett zu der Hypothese, dass verschiedene Ig-Gene rekombinieren ("scrambling process") während der B-Zell-Entwicklung (Dreyer und Bennett 1965). Dank der molekularbiologischen Techniken wurden multiple Genesegmente und deren somatische Rekombination als Grundlage der Antikörper-Diversität nachgewiesen und damit die Dreyer-Bennett-Hypothese bestätigt (Hozumi et al. 1976, Brack et al. 1978, Sakano et al. 1979, Tonegawa et al. 1978 und 1983, Leder et al. 1982).

Die menschlichen Immunglobulin-Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen und sind in V- (Variable), J- (Joining), D- (Diversity) und C- (Constant)- Regionen segmentiert. D-Abschnitte kommen nur bei H-Ketten-Genen vor. Der Kappa-Leichtketten-Gen Locus auf Chromosom 2, Bande 2p13, kodiert 30-200 V-, 5 J- und 1 C-Segmente; das Lambda-Leichtketten-Gen liegt auf Chromosom 22, Bande 22q11, unterteilt in multiple V-, 6-9 J- und C-Segmente. Der Schwerketten (H)-Gen-Locus ist auf Chromosom 14, Bande 14q32 und enthält mehrere Hundert V-, 1-15 D-, 6 J- und multiple C-Regionen (Seidmann et al. 1978, Hieter et al. 1980, McBride et al. 1982, Kirsch et al. 1982, Bartram et al. 1984, Waldmann 1987).

Während der B-Zell Entwicklung finden somatische Rekombinationsvorgänge statt, die die in der Keimbahnordnung weit auseinander liegenden Gensegmente zu einer VDJ-Sequenz zusammenführen. Zu einem frühen Zeitpunkt der B-Zell-Ontogenese werden zunächst je ein DH- und ein JH-Segment miteinander kombiniert. Anschließend erfolgt das Rearrangement mit einem der sechs VH-Gene. In der weiteren B-Zell-Reifung findet die somatische Rekombination der Leichtketten-Kappa V- und J-Regionen und zuletzt der Lambda V- und J-Abschnitte statt (Abb.3.3). Diese Gen-Rearrangements werden enzymatisch katalysiert durch DNS Endo- und Exonukleasen, TdT, DNS-Repariersysteme und eine Rekombinase, die spezifische DNS Sequenzen erkennt, die um die V, D und J Gene plaziert sind und diese flankieren. Diese Genabschnitte werden Heptamer-Nonamer-Sequenzen genannt und kommen sowohl in Ig-, als auch in TZR-Genen vor.

Als weitere Rekombination wird in der späteren B-Zell-Differenzierung der Schwerketten VDJ-Kombination eine C-Region hinzugefügt, resultierend in der Ig-Klassen-Bestimmung. Diese sekundäre Rekombination, auch "class switching" genannt, findet vorwiegend in reifen B-Zellen vor oder während der sekundären Immunantwort statt. Im Rahmen der Transkription werden nicht-kodierende Sequenzen (Introns) enzymatisch herausgeschnitten (RNS-Splicing). In der Plasmazelle können dann über den Vorgang der Translation spezifische Antikörper synthetisiert und sezerniert oder auf der Zellmembran-Oberfläche gereifter Lymphozyten exprimiert werden. (Sakano et al. 1980, Ravetch et al. 1981, Korsmeyer et al. 1981, Waldmann et al. 1987,).

Neben den multiplen Keimbahn V-Genen und deren VDJ- und J_H-Rekombinationen, sowie der Kombination von leichten und schweren Ketten haben auch andere Mechanismen Bedeutung in der weiteren Erhöhung der Immunglobulindiversität: variable (unge-naue) Rekombination, genetisches Cross-over, Inversion und somatische Punktmutationen in der variablen Region (Max et al. 1980, Alt und Baltimore 1982, Bothwell et al. 1981).

1.6.2 T-Zell-Rezeptor-Synthese

T-Zellen entwickeln sich aus im Thymus gereiften Knochenmarkstammzellen. Ausgereifte T-Zellen erkennen spezifisch Antigene durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) nur in Verbindung mit auf den opsonierenden Zellen exprimierten MHC (major histocompatibility complex)-kodierte Moleküle. CD4-exprimierende T-Helfer-Zellen binden an Klasse II MHC-Antigene, zytotoxische T-Zellen (CD8 Expression) an MHC-Peptide der Klasse I (Governman et al. 1986, Royer 1987).

Der menschliche, antigen-spezifische TZR ist ein polymorphes, durch Disulfid-Brücken verbundenes Heterodimer, bestehend aus einer 45 000 bis 50 000 Dalton alpha-Untereinheit und einer 40 000 bis 45 000 Dalton großen beta-Untereinheit. Dieses Heterodimer ist Bestandteil eines aus weiteren drei monomorphen Peptidketten (T 3) zusammengesetzten Makromoleküls (Acuto et al. 1985, Reinherz et al. 1982, Kronenberg et al. 1986). Der T3 Komplex besteht aus einem gamma (25 000 Dalton), delta und epsilon

(je 20 000 Dalton) Molekül und erscheint verantwortlich für die Signalübermittlung ins Zellinnere, während die alpha- und beta-Kette des TZR die spezifische Antigen-Bindung gewährleistet.

Die kodierenden Genloci der TZR-Untereinheiten sind in Tabelle 1.4 wiedergegeben.

Tab. 1.4

T-Zell-Rezeptor-Gen	Chromosom (Bande)
alpha	14 (q11)
beta	7 (q35)
delta	7 (p14-15)
gamma	14 (q11)

Die Keimbahnkonfiguration des TZR- Gens ist aus multiplen Gensegmenten aufgebaut, ähnlich den IgH-Gensegmenten (Davis et al. 1988): ca. 100 variable Regionen ($V\beta$) und zwei in Tandem organisierte Komplexe aus D-, J- und C-Segmenten ($D\beta 1-6 J\beta 1-C\beta 1$ und $D\beta 2-6 J\beta 2-C\beta 2$). Die zwei konstanten Regionen differieren lediglich in 6 Aminosäuren der translierten Abschnitte. Das TZR- Gen setzt sich zusammen aus ungefähr 100 V-Regionen ($V\alpha$), einer sich über 60 Kb erstreckenden Joining-Region, die aus 50 bis 100 Ja-Segmenten besteht, sowie einer konstanten $C\alpha$ -Region. Bisher wurden keine D-Segmente entdeckt (Saito et al. 1984, Hood et al. 1985, Siu et al. 1984, Minden et al. 1986, Royer et al. 1987). In manchen T-Zell-Subpopulationen werden allerdings die von den γ - und δ -Genfamilien kodierten Heterodimere exprimiert.

Die TZR-Gene sind nicht nur in ihrer Organisation den Ig-Genen sehr ähnlich, sondern zeigen auch Analogien in der somatischen Gen-Rekombination während der lymphozytären Ontogenese, sowie deren enzymatisch signalisierter Steuerung. Darüberhinaus können, im Gegensatz zum B-Zell-Rearrangement, $D\beta$ -Segmente direkt an $V\beta$ -Segmente gekoppelt werden. Die TZR α -Gen-Rekombination verläuft ähnlich der Ig Lambda-Ketten Kombination durch direkte $V\alpha$ - $J\alpha$ Koppelung.

1.7 Therapie von Leukämie- und Lymphomkrankungen

Die Therapie von Lymphomen und Leukämien richtet sich in erster Linie nach Krankheits-Klassifikation, der histologischen bzw. zytologischen Einteilung, dem Malignitätsgrad, dem Stadium sowie dem Alter des Patienten. Neben der Chemo- und Radiotherapie wird die Knochenmarktransplantation (KMT) und seit ca. 10 Jahren zunehmend die Blutstammzelltransplantation nach hochdosierter, z.T. myeloablativer Chemotherapie angewandt (O'Reilly et al. 1983, Philip et al. 1987, Zander et al. 1991). Man unterscheidet syngene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation zwischen eineiigen Geschwistern, allogene von HLA (human leukocyte antigen)-identischen oder partiell HLA-kompatiblen Fremdspendern und autologe Transplantation, bei der das vorher kryokonservierte und aufbereitete Knochenmark oder die isolierten Stammzellen des Erkrankten reinfundiert werden. Die myeloablative Therapie ist eine hochdosierte Zytostatika-Therapie, häufig kombiniert mit einer Ganzkörperbestrahlung, die auch die reguläre Hämopoese supprimiert und damit vor Transplantation zur Knochenmarkinsuffizienz führt. Darüberhinaus werden auch Schleimhäute, Haut, Leber, Lunge und andere Organe reversibel geschädigt. Diese Therapie vor allogenen Transplantationen wird Konditionierung genannt. Insgesamt ist die therapiebedingte Morbidität und Mortalität naturgemäß nicht unerheblich. In jüngster Zeit werden Studien mit nicht myeloablativer Therapie und niedrig dosierter Konditionierung vor allogener Transplantation durchgeführt, der sich dann die Stammzellübertragung anschließt (Mini-Allografting oder meta-kine Transplantation). Basis für diese neue Therapiestrategie ist der unten beschriebene Spender-versus-Tumor-Effekt (Carella et al. 2000).

1.7.1 Stammzelltransplantation

Das Knochenmark enthält die pluripotenten Stammzellen, die aus den totipotenten hervorgehen. Aus den pluripotenten Stammzellen gehen die CD34-positiven Progenitor- bzw. Stammzellen hervor. Diese können aus dem Knochenmark aspiriert werden, wobei in der Regel zweimal 10^{10} mononukleäre KM-Zellen in 1000-1200ml Volumen gewonnen werden. Nach Gabe hämopoetischer Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) oder Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) können Blutstammzellen auch in das Blut ausgeschwemmt werden (Siena et al. 1991; Krause et al. 1996). Über eine Blutzellseparation (Leukapherese) können CD34-positive Stammzellen für die periphere Stammzelltransplantation gewonnen werden (Schmitz et al. 1995, Link et al. 1996). Diese werden dann bei der allogenen Transplantation vom Fremdspender (matched unrelated donor) oder Familienspender (matched related donor) dem Erkrankten infundiert. Bei der autologen Stammzelltransplantation kommt es zur Übertragung der vom erkrankten Patienten gewonnenen Stammzellen. Der autologen Stammzelltransplantation kann ein Versuch der Entfernung maligner Zellen aus dem Transplantat (in-vitro Purging) vorausgehen (Krüger et al. 1996). Dabei werden Zytostatika, monoklonale Antikörper oder eine selektive Anreicherung von Stammzellen zur Eliminierung von Tumorzellen aus dem Transplantat angewendet. Als akzeptierte Indikationen für die Stammzelltransplantation gelten a) Tumorerkrankungen nach myeloablativer Ganzkörperbestrahlung, hochdosierter Chemotherapie, b) Substitution defekter oder fehlender Zellen der Hämato- oder Lymphopoese, c) Tumorbehandlung durch Graft-versus-Tumor-Effekt, d) Speichererkrankungen bei fehlender körpereigener Enzyymbildung (Link et al. 1997). Hierbei kann eine langfristige Krankheitsfreiheit oder Heilung erreicht werden.

Komplikationen neben der durch die temporäre Knochenmarkinsuffizienz nach Hochdosis-Chemotherapie bedingten Infektanfälligkeit sind bei der allogenen Knochenmark- und Stammzelltransplantation vor allem akute und chronische Abstoßungsreaktionen, die auf einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GVHD) beruhen. Dabei handelt es sich um eine Reaktion von Spender-T-Lymphozyten gegen unterschiedliche Gewebsty-

pen des Empfängers bei Differenzen der Minor- oder Major-Histokompatibilitätsantigene, die bei Ausbildung des entsprechenden Krankheits-syndroms vor allem Haut, Leber und Darm betrifft (Vogelsang et al. 1994).

1.7.2 Donor-Lymphozyten Gabe

Als weitere Zelltherapie hat sich die Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) in letzter Zeit etabliert. Beobachtungen, dass Leukämie-Patienten mit GVHD weniger häufig Rezidive bilden als Patienten ohne GVHD, führten zu der Vermutung, dass T-Lymphozyten allogener Spender einen Graft-versus-Leukämie-oder Graft-versus-Tumor-Effekt (GVL) aufweisen (Horowitz et al 1990). Durch DLI kann dieses Phänomen therapeutisch eingesetzt werden. Aufgrund des konkurrierenden Effektes von GVHD und GVL wurden DLI erst nach Toleranz-Entwicklung gegenüber dem Transplantat verabreicht. Inzwischen konnte durch DLI bei Patienten mit Rezidiv einer chronischen myeloischen Leukämie nach Transplantation in 70-80% eine komplette Remission erreicht werden, teilweise ohne zusätzliche Chemo-oder Bestrahlungstherapie (Kolb et al. 1995). Eine Weiterentwicklung dieser Therapie könnte eine Generierung oder Selektion Leukämie-reaktiver zytotoxischer T-Lymphozyten sein, die in vitro durch ein Zell-Assay bestimmt werden (Falkenburg et al. 1999).

2. Zielsetzung und experimentelles Design

Die Entdeckung minimaler maligner, monoklonaler Zellkontamination in Knochenmark und peripherem Blut (minimale Resterkrankung) ist von besonderem klinischem Interesse für die Bewertung der Effizienz von Chemotherapie-Schemata, Prognose und Verlauf der Erkrankung, die frühe Entdeckung eines Rezidivs oder die Quantifizierung verbliebener maligner Zellen in Aspiraten für die autologe Knochenmark- oder Stammzelltransplantation.

Leukämien und Lymphome weisen in der Mehrzahl Immunglobulin- oder T-Zellrezeptor-Gen-Rearrangements als monoklonale Merkmale auf, dessen molekulargenetischer Nachweis in den frühen 80er Jahren gelang (Korsmeyer et al. 1983, Arnold et al. 1983). Im Vergleich zu zyto-morphologischen und Immunphänotypisierungs-Techniken können molekulare Analysen, insbesondere DNS-Filterhybridisierungs (Southern-Blot)- und PCR-Verfahren, durch Nachweis von Monoklonalität auf genetischer Ebene die Sensitivität in der Entdeckung morphologisch okkult maligner Zellen entscheidend verbessern (Yokota et al. 1991, Potter et al. 1993).

Zur Etablierung und Sensitivitätsbestimmung des in dieser Arbeit vorgestellten Assays werden Lymphom-Zellen in einer Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10⁶ mit gesunden Knochenmarkzellen vermischt und für sechs Wochen in ein Kultursystem gebracht. Jede Woche wird die Hälfte der Zellen entfernt, jeweils ein Pappenheim-gefärbtes Zyto-zentrifugationspräparat angefertigt und die Kultur mit frischem Medium aufgefüllt. Aus den entnommenen Zellen wird die genomische DNS extrahiert, restriktions-enzymatisch gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch DNS-Hybridisierungsexperimente mit einer spezifischen Gensonde sollen monoklonale Gen-Rearrangements identifiziert werden.

Im Rahmen der angeschlossenen klinischen Studie wird durch diese Kombination von molekulargenetischer Analyse, zytomorphologischer Technik und Langzeit-zellkulturverfahren die minimale maligne Kontamination durch lymphatische Tumorzellen in

Knochenmark und Blut untersucht und mit dem klinischem Verlauf der Erkrankung hinsichtlich ihrer klinischen Signifikanz beurteilt.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gleichspannungs-Stromversorger: Multi Drive XL; submarine Gelelektrophorese-Kammer: GNA 200/300, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden; UV-Transilluminator: UVP, Fa. AGS, Heidelberg; Sofortbildkamera und Filme: 667, Fa. Polaroid, Offenbach; Hybridisierungsinkubator: 7601, Fa. GFL, Burgwedel; Röntgenkassette und Röntgenfilme: Fa. Kodak, Stuttgart; Kühltruhe (-80°): puffer hubbard, Fa. Harris, USA; Geiger-Müller-Zählrohr: LB 1210 B, Fa. Berthold, Wildbad; Thermoinkubator: Dry-Block 2A, Fa. Techne, Duxford, Großbritannien; Schüttelwasserbad: 1083, Fa. GFL, Burgwedel, Laborzentrifuge: Megafuge 1.0 R Rotanta RP, Fa. Hettich, Tuttlingen; Eppendorfszentrifuge: 5415 c, Thermomixer: 5436; Fa. Netheler & Hinz, Hamburg; Vakuumpumpe: type 2002 B, Fa. Alcatel; Vacuumexiccator: Fa. Hetovac; Kühlzentrifuge: JS-21; Fa. Beckmann, München; Laborschüttler: REAX 2, Fa. Heidolph; Schüttelinkubator: Fa. Infrs AG, Bottmingen, Schweiz; Scintillations-zählgerät: LS 1701; Fa. Beckmann, München; Spectro-photometer: DU-40, Fa. Beckmann, München ; CO₂-Brutschränke: Fa. Heraeus, Hanau; pH-Meter: 763 Multi-Calimatic, Fa. Knick, Berlin; Coulter-Counter: ZM; Folienschweißgerät: C 220, Fa. Joisten & Kettenbaum, Bergisch Gladbach; Mikroskop: Biomed, Fa. Leitz , Wetzlar; Invertmikroskop: Wilovert S, Wetzlar

3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Hybond Nylon Membranen, Desoxycytidin 5'-[P³²] triphosphat, 3000 Ci/mmol; Fa. Amersham-Bucheler, Braunschweig. Nylon Membranen positively charged, Random Primed DNA Labeling Kit, Glycogen, Restriktionsenzyme Hind III, EcoR I, Bgl I, PST I, BamH I; Fa. Boehringer, Mannheim. Quiagen Plasmid Kit, Quiaex DNS Extraktions Kit; Fa. Diagen GmbH, Hilden. Agarose Ultrapure, Kulturmedium RPMI 1640; Fa. Gibco, Karlsruhe. Fötale Kälberserum, Fa. Hyclone. Ficoll; Fa. Nunc. Rinderserum-Albumin (BSA), EDTA, Natriumlaurylsulfat (SDS), Polyethylenglycol, 2-Mercaptoethanol, Ethidium-bromid, Polyvinylpyrrolidon, Borsäure, Metylen-Blau, Bromphenol-Blau, Xylen-Cyanol FF, Proteinase K; Fa. Sigma, St. Louis, USA. Whatman Filterpapier, Fa. Whatman, Balston, Großbritannien. Ampicillin, Tetracyclin; Fa. Serva, Heidelberg. Ethanol, Chloroform; Apotheke UKE. Bacto-Tryptone, Bacto-Yeast-Extrakt; Fa. Difco, Detroit, USA. Sephadex G 50; Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Nicht genannte Artikel wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

3.3 Tumorzell-Linien

Für die Experimente zur Bestimmung der Tumorzell-Nachweisgrenze wurden die malignen B-Zell-Lymphom-Linien Raji (Burkitt-Lymphom, EBV-assoziiert) sowie ST 486 (Burkitt-Lymphom, EBV negativ) und eine Lymphom-Zell-Linie der T-Zell-Reihe, Molt 3, verwendet (ATCC, Rockville, Md., USA).

3.4 Isolierung mononukleärer Leukozyten

Humane mononukleäre Zellen (MNZ) wurden aus peripherem Blut und Knochenmark-Aspiraten isoliert. Zur Separation der MNZ diente ein physikalisches Trennverfahren über einen Dichtegradienten ($1,077\text{g/cm}^3$) mittels Ficoll, einem hydrophilen Zucker-Polymer. Erythrozyten und polymorph-kernige Leukozyten wandern aufgrund ihrer hohen Dichte durch den Gradienten, während Thrombozyten im Überstand verbleiben. Die Lymphozyten befinden sich in der Interphase.

Heparinisiertes Blut wurde 1:2, Knochenmark 1:4 mit PBS-Puffer verdünnt und auf eine Ficoll-Schicht aufgetragen unter Vermeidung von Vermischung. Anschließend wurde 30 Minuten mit $400\times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die in der Interphase befindlichen Lymphozyten wurden unter sterilen Bedingungen abpipettiert und zweimal in PBS gewaschen. Eine Resuspension erfolgte in TRIS-gepuffertem Ammoniumchlorid, pH7,2, für 5 Minuten, um reife Erythrozyten zu lysieren. Nach Trypan-Blaufärbung und Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden die mononukleären Knochenmarkzellen zur Anlage einer Knochenmark-Langzeitkultur weiterverwendet.

3.5 Knochenmark-Langzeitflüssigkultur

Isolierte mononukleäre Knochenmarkzellen, z.T. auch unter Beimengung verschiedener Lymphomzell-Konzentrationen, wurden in 25cm^2 Kulturfläschchen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen pro 10ml Medium gegeben. Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640, 20% foetales Kälber-Serum, 1% Phytohämagglutinin-konditioniertes Medium, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin ($100\mu\text{g/ml}$). In Wasserdampf-gesättigtem 5% CO_2 /Luft-Gemisch wurden die Zellkulturen bei 33°C bis zu 6 Wochen inkubiert (Philip et al. 1984). Wöchentlich wurde die Hälfte der Zellen zur Zellzahl-Bestimmung mittels eines elektronischen Zellzählers (Coulter-Counter) sowie für die Anfertigung eines Pappenheim-gefärbten Zytozentrifugen-Präparates entnommen. Die restlichen Zellen wurden für die DNS-Isolierung pelletiert und eingefroren.

3.6 Zytospinpräparate und Färbung nach Pappenheim

Aliquots der gewonnenen Zellen wurden in einen auf einem Objektträger angebrachten Zylinder gegeben und bei 400g auf den Glasträger zentrifugiert. Zur Anfärbung wurden die luftgetrockneten Präparate für 3 Minuten in konzentrierte May-Grünwald-Stammlösung gebracht. Anschließend wurde eine ca. 20-minütige Färbung mit der Giemsa-Gebrauchslösung durchgeführt, mit reichlich Wasser gespült und zuletzt luftgetrocknet. Die Präparate dienen zur mikroskopischen Analyse.

3.7 Agarosegelelektrophorese von DNS

Agarose ist ein aus Agarophyten (Rotalgen) extrahiertes lineares Polysaccharid, bestehend aus D-3,6-Anhydrogalaktose und L-Galaktose. Aufgrund ihrer Gelierfähigkeit und neutralen Ladung eignet sich Agarose für die Gelelektrophorese von DNS.

Da DNS bei neutralem pH eine negative Ladung besitzt und im elektrischen Feld zur Anode wandert, können Plasmide und DNS-Restriktionsfragmente der Größenordnung 200 Basenpaare (bp) bis 50 Kilobasenpaare (kb) in Agarosegelen aufgetrennt werden. Die elektrophoretische Mobilität ist abhängig von der Agarosekonzentration, der Stromstärke, dem Ionengehalt des Laufpuffers, der DNS-Konformation und vom Logarithmus des Molekulargewichts der DNS. Die Laufgeschwindigkeit der DNS ist umgekehrt proportional zum Zehner-Logarithmus der Basenpaar-Anzahl.

Die Beziehung zwischen elektrischer Mobilität (m) und Gelkonzentration (c) wird durch die Gleichung $\log m = \log m_0 - K c$

(m_0 : freie elektrophoretische Mobilität der DNS; K : Retardationskoeffizient) beschrieben.

Die DNS kann sichtbar gemacht werden durch das Anfärben mit Etidiumbromid. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit der DNS durch Interkalation und fluoresziert unter UV-Transillumination.

Die Herstellung eines 0,8% Gels erfolgte durch Aufkochen von 0,8g Agarose in 100ml Tris-Borat- oder Tris-Acetat- Puffer in einem Erlenmeyerkolben bis zum vollständigen Aufklaren der Lösung. Nach Abkühlen auf unter 60°C und Zugabe von 1µl Ethidiumbromidlösung, wurde das Gel in eine vorher präparierte, 9X10cm² oder 20X20cm² messende, Kammer gegossen. Ein Kamm wurde in das Gel plaziert zur Herstellung von Aussparungen. Nach der Verfestigung wurde das Gel horizontal in die mit Laufpuffer aufgefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNS-Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit Gel loading Puffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Bei einer Feldstärke von max. 5V/cm wurden die Restriktionsfragmente über 16 Stunden bei einer Stromstärke von 160-180mA und einer Spannung von 40V aufgetrennt. Zu Beginn des Gellaufes wurde für 30min eine Spannung von 120V benötigt, damit die DNS-Proben in die Agarose hineindiffundieren. Sobald der Xylen-Cyanol-Farbstoff das untere Gelende erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Unter UV-Tranillumination wurde zur Dokumentation ein Photo angefertigt (Maniatis et al. 1982).

Tris-Borat-Puffer: 90mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 90mM Borsäure; pH8,3

Tris-Acetat-Puffer: 40mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 40mM Eisessig; pH8,0

Gel loading Puffer: 0,25% Bromphenol Blau, 0,25% Xylen- Zyanol FF, 15% Ficoll

Ethidiumbromid Lsg.: 10mg Ethidiumbromid in 1ml Aqua bidest.

3.8 Isolierung genomischer DNS

Hochmolekulare genomische DNS besteht aus langen Fadenmolekülen mit Molekulargewichten in der Größenordnung von 10⁸ bis 10⁹. Sie ist Bestandteil der Chromosomen und kann aus Zellkernen isoliert werden. Lysierung von Zytoplasma- und Kernmembran erfolgte mit Natrium-Laurylsulfat, einem Netzmittel. Nach enzymatischer Verdauung der Proteine, können diese durch Solubilisierung in Phenol und darauffolgende Zentrifugation von der DNS getrennt werden. Anschließend wird die DNS durch Alkohol ausgefällt.

In 2ml Tris-NaCl-Puffer gelöste 10^7 Zellen wurden unter Zusatz von 0,5% Natrium-Laurylsulfat und 100g Proteinase K inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter stärkerem Schütteln die ersten 30 Minuten bei 65°C , dann weiter über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das gleiche Volumen Phenol hinzugefügt und die Lösung 10 Minuten in einem Laborschüttler kräftig durchmischt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 2400UpM und 4°C wurde die die DNS enthaltende wässrige Phase abpipettiert und der Vorgang wiederholt. Die in Phenol gelösten Fette sowie die in der Interphase befindlichen denaturierten Proteine wurden jeweils verworfen. Entsprechend erfolgte die weitere Behandlung des Überstandes zunächst mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch im Verhältnis 25:24:1, einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch im Verhältnis 24:1 und schließlich mit reinem Chloroform. Hierdurch wurden die im Phenol gelösten Proteine von der DNS getrennt. Um die DNS zu fällen, wurden 2ml Überstand auf eine 0,4M Lithium- Chlorid-Lösung eingestellt. Sofort nach Zugabe von einem 2,5 fachen Volumen (5ml), auf -20°C vorgekühltem Alkohol , wurde die DNS mit einer sterilen, gekrümmten Pasteur-Pipette durch sanftes Drehen aufgefädelt. Alternativ wurde die DNS über Nacht bei -20°C gefällt und nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15000Xg pelletiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen des Pellets in 70% eisgekühltem Alkohol. Nach Lösen der DNS in 50-100 l Tris- EDTA-Puffer erfolgte jeweils ein Aufquellen bei 65°C für 15 Minuten. Der DNS-Gehalt wurde im UV-Spektrophotometer ermittelt, indem die Extinktion bei 260nm Wellenlänge gemessen und dieser Wert mit 50 multipliziert wurde. Der Quotient OD 260nm:OD 280nm lag jeweils zwischen 1,70 und 1,90. Dieser Wert zeigt an, dass kaum Verunreinigung mit Proteinen vorlag. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt (Blin and Stafford 1976).

TNE-Puffer: 20mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 2mM EDTA, pH8,0

Phenol: Äquilibrierung von 1l wässrigem Phenol durch mehrmaliges Extrahieren mit TNE-Puffer, pH8. Lagerung unter einem gleichen Volumen TNE + 1g 8, OH-Chinolin bei 4°C .

3.9 Restriktionsenzymatische DNS-Fragmentierung

Restriktionsendonucleasen sind bakteriogene Enzyme, die bestimmte Sequenzen in doppelsträngiger DNS erkennen und spalten können. In Bakterien dienen sie wohl der Abwehr von Phagen-Infektionen, während die eigenen Nucleinsäuren durch Methylierung der Basen geschützt sind. Die von den hier verwendeten Typ II Restriktionsendonucleasen geschnittenen Oligonukleotidsequenzen sind Palindrome, erkennen also die DNS-Sequenz sowohl in 3'5' Richtung, als auch umgekehrt. Eine Enzymeinheit (1U) schneidet 10g von -DNS in einer Stunde. In Tabelle 3.1 werden die Endonucleasen mit ihren Schnittstellen und Inkubationspuffern aufgezeigt (Roberts 1983; Fuchs and Blakesley, 1983) .

Tab. 3.1

Enzym	Mikro- organismus	Schnittsequenz	Puffer
BamH I	Bacillus amylolique-faciens	G]GATCC CCTAG[G	High-Salt
Bgl II	Bacillus globigii	A]GATCT TCTAG[A	Medium-Salt
Hind III	Haemophilus influenzae	A]AGCTT TTCGA[A	High-Salt
Pst I	Escherichia coli ED 8654	CTGCA[G G]ACGTC	High-Salt

Genomische, hochmolekulare DNS wurde für das Southern-Blot-Verfahren mit Restriktionsendonucleasen geschnitten; hierfür wurden annähernd gleiche Mengen in der Größenordnung von 10-30µg eingesetzt. Plasmid-Präparationen wurden enzymatisch gespalten, um die jeweilige Gen-Sonde zu isolieren. Die Proben-Volumina wurden so eingestellt, dass das Enzym-Glycerol Gemisch kleiner als 5% des Endvolumens betrug, da andernfalls eine Enzymhemmung eintreten würde. Für 10µg DNS wurden 1-3 Enzy-

meinheiten eingesetzt. Ein Reaktionsansatz benötigte den für die jeweilige Restriktionseendonuklease erforderlichen Inkubationspuffer in der Endkonzentration von 1:10 Volumenanteil, um die entsprechende Salz-Konzentration einzustellen. Nach guter Durchmischung erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht oder 60 Minuten mit anschließendem fünfminütigen Hitzeschock bei 65°C zur Inaktivierung der Endonucleasen. Die Proben wurden draufhin mit dem gel loading Puffer im Verhältnis 1:6 gemischt und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNS-Molekulargewichts-Standard diente mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnittene Bakteriophagen -DNS. Diese enthält DNS-Fragmente in der Größenordnung von 23.13, 9.42, 6.68, 4.36, 2.32, 2.03 und 0.56 kb.

10 x Medium-Salt-Puffer: 100mM Tris/HCl, 100mM MgCl₂,
10mM Dithiothreitol,
500mM NaCl; pH 7,5

10 x High-Salt-Puffer: 500mM Tris/HCl, 100mM MgCl₂,
10mM Dithiothreitol,
000m NaCl; pH 7,5

3.10 Isolierung kleiner Mengen Plasmid DNS

Plasmide liegen in der Regel als zirkulär geschlossene Moleküle vor. Diese Form bleibt auch bei alkalischem pH stabil. Hochmolekulare chromosomale DNS wird denaturiert und als Proteinkomplex in unlöslicher Form ausgefällt. Die im basischen Milieu gelöste Plasmid-DNS kann nach Alkoholfällung extrahiert werden.

In einem Eppendorfhütchen werden 1,5ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur mit 100µl Doly I sowie 10µl Lysozym versetzt. Nach kräftiger Durchmischung erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Daraufhin Zugabe von 200µl Doly II und erneute fünfminütige Inkubation auf Eis. Nach weiteren fünf Minuten wurde das Lysat mit 150 µl Doly III gemischt, wieder fünf Minuten auf Eis plaziert und nochmals abzentrifugiert. Die Überstände wurden in Eppendorfhütchen mit je 250µl Phenol und Chlo-

roform gemischt und bei 14000 UpM zentrifugiert, erneut mit 500µl Chloroform vermischt und zentrifugiert und schließlich mit 1ml Alkohol versetzt und eine Stunde bei -20°C gefällt. Das durch fünfzehnminütige Zentrifugation gewonnene Plasmid-DNS-Pellet wurde in 100µl TE gelöst, 30 Minuten bei 37°C mit RNase inkubiert und dadurch von RNS befreit, anschließend mit 60µl 20% PEG-Lösung 1 Stunde auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Diese Pellets wurden in 20µl TE aufgenommen (Birnboim und Doly 1979).

Doly I: 50mM Glucose, 25mM Tris/HCl, pH7,5, 0,5M EDTA
Doly II: 0,2M NaOH, 1% SDS
Doly III: 3M K-Acetat, 3M Essigsäure
TE: 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH8,0
PEG-Lösung: 20% Polyethylenglykol, 2,5M NaCl

3.11 Plasmid isolierung im Anionen-Austausch Verfahren

Um größere Mengen Plasmid-DNS zu isolieren, wurde eine Anion-Austausch-Trennung der DNS vorgenommen unter Verwendung einer Quiagen-Harz-Säule. Diese besitzt eine hydrophile Oberfläche, die an Silikat gebundene DEAE-Gruppen enthält und daher eine extrem hohe Ladungsdichte aufweist. Zusätzlich besitzt die Quarz-Säule eine Porengröße von ca. 100µm. Ladungsdichte und Porengröße gewährleisten eine große Trennungsbreite von 0,1M bis 1,6M Salz-Konzentration. Nukleinsäuren binden an die Silikatgel-Oberfläche in der Gegenwart hoher chaotroper Salzkonzentrationen. Durch Äquilibrierung der Bindungs-puffer wird erreicht, dass selektiv Einzel- und Doppelstrang-DNS an die Quarzsäule bindet und Carbohydrate, RNS und Proteine herausgewaschen werden können. Anschließend kann die DNS bei niedriger Salzkonzentration eluiert werden.

Das Pellet einer 500 ml Kultur wurde nach Zugabe von 100 µg/ml RNase A in 10ml Puffer 1 gelöst. Einer fünfminütigen Zell-Lyse mit 200mM NaOH, 1% SDS unter sanftem Schütteln, folgte eine Zugabe von 4ml 3M K-Acetat, pH5,5 mit anschließender In-

kubation auf Eis für fünf Minuten. Die Lösung wurde 30 Minuten bei 30.000Xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zwischendurch erfolgte die Äquilibrierung der Silikatsäule mit 4ml Puffer QBT. Der Überstand wurde sofort über die Quarzsäule gegeben und mit 2X10 ml Puffer QC gewaschen, um die Protein- und RNS-Kontaminationen zu entfernen. Daraufhin wurde die DNS mit 5ml Puffer QF eluiert. Es folgte eine DNS-Präzipitation mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol, Zentrifugation bei 15.000Xg und 4°C für 30 Minuten und Waschen der DNS in 5ml 70% Alkohol. Nach fünfminütiger Lufttrocknung wurde die DNS in TE-Puffer gelöst.

Puffer 1: 50mM Tris/HCl, 10mM EDTA; pH 8,0

Puffer QBT: 750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7,0; 15% Triton X-100

Puffer QC: 1,0M NaCl, 50mM MOPS, 15% Ethanol; pH 7,0

Puffer QF: 1,25M NaCl, 50mM Tris/HCl, 15% Ethanol; pH 8,5

3.12 DNS-Extraktion aus Agarosegelen

DNS kann unter Schmelzen von Agarose direkt aus Gelen quantitativ extrahiert werden. Hierbei wird ebenfalls die Eigenschaft der Nucleinsäuren an Silikat-Gel-Partikel zu adsorbieren, ausgenutzt.

Restriktionsenzymatisch gespaltene Plasmid-DNS wurde auf einem horizontalen, niedrig schmelzenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE verwendet, da Bor-Ionen im TBE-Puffer die Solubilisation stören. Unter UV-Durchleuchtung wurde das zu eluierende DNS-Fragment aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in einem Eppendorfhütchen mit 300l QX1-Puffer pro 100mg Gel solubilisiert. Nach Zugabe von 10µl Silikat-Partikel-haltige Quiaex -Lösung wurde der Ansatz bei 50°C für 10 Minuten inkubiert. Die gebundene DNS wurde bei 14.000Xg abzentrifugiert und in 500l Puffer QX2 gelöst. Erneuter Zentrifugation folgte ein Lösen des Pellets in 500l Puffer QX3. Wieder wurde die Lösung zentrifugiert und das Pellet schließlich in TE gelöst, fünf Minuten bei 50°C inkubiert, um die DNS vom Silikat zu lösen, und für 30s abzentrifugiert. Die im Überstand gelöste DNS wurde bei -20° C gelagert.

Puffer QX1:	3M NaCl, 4m Na ClO ₄ , 10mM TRis/HCl; pH 7,0
Puffer QX2:	8M NaClO ₄ , 10mM Tris/HCl; pH 7,0
Puffer QX3:	70% Ethanol, 100mM NaCl, 10mM Tris/HCl; pH 7,5
10 x TAE :	100mM Tris/HCl, 50mM Na-Acetat, 5mM EDTA; pH 7,8 (mit Essigsäure eingestellt)

3.13 Anzucht klonierter Bakterienstämme

Bakterien können durch den Vorgang der Transformation Plasmid-DNS aufnehmen. Durch vorherige Integration von DNS-Sequenzen in geeignete Vektor-Plasmide mittels einer Ligation, können diese durch Anzucht der Bakterien vervielfältigt und durch Plasmid-Präparation isoliert werden. Das high copy Vektorplasmid pBR 322 hat eine Größe von 4362 Bp, enthält das Replikon pMB1, das Ampicillinresistenzgen Tn3 und das Tetracyclinresistenzgen pSC101 (Sutcliffe 1978).

Zur Anzucht apathogener HB101 E. coli Bakterienstämme erfolgte ein Drei-Ösen-Ausstrich der Bakterien auf einer Agarose-LB-Medium-Platte. Dem Nährmedium wurden je nach Resistenz entweder Ampicillin oder Tetracyclin in einer Endkonzentration 50µg/µl beigegeben. Nach einer zwölf-Stunden Inkubation bei 37°C wurde eine Kolonie entnommen und in einem größeren Volumen LB-Flüssigmedium in einem Schüttelinkubator gezüchtet bis eine Sättigung von 1×10^9 Zellen pro ml, entsprechend einer Extinktion von 1-1,5 E₆₀₀/ml, erreicht wurde. Anschließend wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Im Anschluß hieran erfolgte die Plasmid-DNS-Isolierung.

Luria-Bertani (LB)-Medium: 1% Bacto- Tryptone, 0,5% Bacto Yeast-Extrakt,
1% NaCl, pH 7.5

3.14 Beschreibung der verwendeten Gen-Sonden

Die hier verwendete Immunglobulin-Gen-Sonde besteht aus einem 2,5 Kb großem Keimbahnfragment, das Teile der Schwereketten-Joining-Region (JH) kodiert. Sie kann mit der Keimbahn- und der rearrangierten Immunglobulin-Gen-Konfiguration hybridisieren. Abhängig von der Wahl des Restriktionsenzymes, mit dem die zu untersuchende DNS geschnitten wird, hybridisiert die Sonde mit der Keimbahn-DNS auf Höhe einer bestimmten Molekulargewichtsgröße. Abweichende Hybridisierungssignale werden als klonale Gen-Rearrangements bewertet. Bei den hier verwendeten Restriktionsendonukleasen Bam HI zusammen mit Hind III hat das gebildete Keimbahn-Konfiguration Hybrid eine Größe von 5,6 Kb.

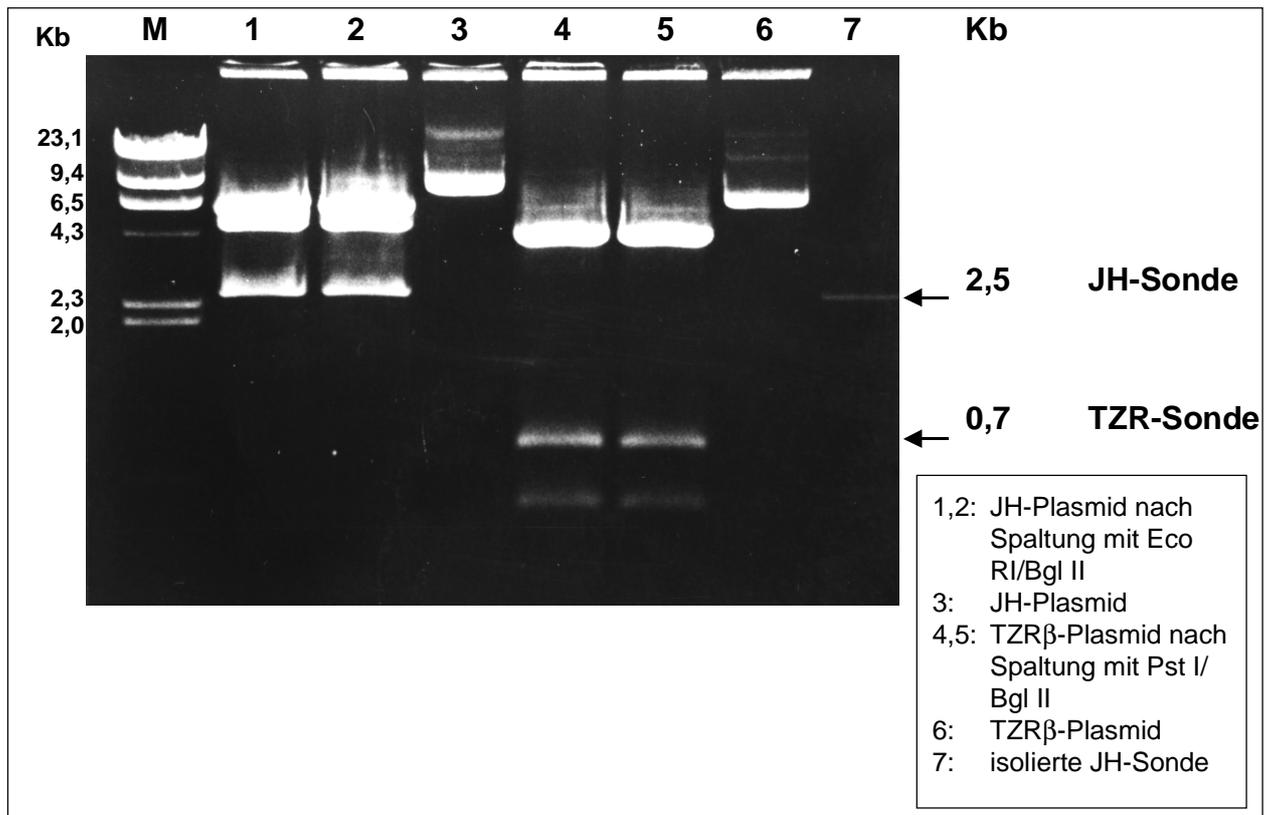
Für die Hybridisierung des T-Zell-Rezeptor-Gens wurde eine 0,7 Kb große Sonde eingesetzt, die die konstante Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptor-Gens (TZR β) kodiert. Bei Hind III geschnittener DNS ergibt die Hybridisierung in der Keimbahn-Konfiguration ein Signal bei 7,7 und 3,7 Kb.

Tabelle 3.2, S.30 zeigt die entsprechenden Hybridisierungssignale restriktionsenzymatisch fragmentierter DNS mit den JH- und TZR β -Sonden. Abb.3, S. 30 zeigt die im Agarosegel aufgetrennten restriktionsenzymatisch gespaltene Plasmide, die die hier verwendeten Gensonden enthalten.

Die Proben wurden uns freundlicherweise von Frau Dipl. Biol. S. Heinsohn, UKE-Kinderklinik, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Abb. 3

Restriktionsenzymatische Spaltung der Plasmide, die spezifische Hybridisierungssonden enthalten.



Tab. 3.2

DNS-Sonde	Größe (Kb)	Chromosom	Lokus	Restrikt. Enzym	Keimbahn (Kb)
JH	2,5	14	Ig-Schwerketten-Region	BamHI+ HindIII	5,6
				BamHI	17
				EcoRI	16
TZR β	0,7	7	T-Zell Rezeptor-β-Kette, C-Region	BamHI	23
				EcoRI	12 + 7,2
				HindIII	7,7 + 3,7

3.15 DNS-Blot auf Nylon-Membranfilter

Über einen kapillären Transfer können DNS-Restriktionsfragmente, die in der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, vom Gel auf eine solide Matrix flächentreu transferiert werden. Die Kapillarkraft rührt von dem Sog aufgelegter, trockener Absorbtions-Papiertücher her. Auf physikalisch stabilen Nylon-Membranen fixierte DNS kann so weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Vor dem Blot-Verfahren folgt der in der Agarose befindlichen DNS, eine fakultative Depurinierung in schwacher Säure und anschließende Denaturierung in starker Lauge. Hierbei werden die Wasserstoffbrücken-Bindungen der Doppel-Helix gespalten, damit die DNS in Einzelstrangform vorliegt und eine spätere spezifische Gen-Sonden-Bindung stattfinden kann (Southern 1975).

Das unter UV-Transillumination photographierte Agarose-Gel wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten sanft in 0,2M Salzsäure geschüttelt; anschließend in Aqua bidest gewaschen und 45 Minuten in Denaturierungs-Lösung inkubiert. Diese Lösung wurde mehrere Male erneuert. Anschließend wurde das Gel in eine Neutralisations-Lösung gelegt. Über eine mit 10xSSC gefüllten Glas-Schüssel wurde eine Glasplatte zur Brückenbildung plziert. Auf die Glasplatte wurden zwei Lagen 3 mm Whatman-Papier gelegt, so dass deren Enden in die SSC-Lösung tauchen konnten. Auf das Whatman-Papier wurde das Agarose-Gel, und hierauf eine vorher zurechtgeschnittene Nylon-Membran blasenfrei kontaktiert. Den Abschluß des Sandwiches bildeten zwei in SSC befeuchtete Lagen Whatman-Filter die von einer 20 cm hohen Zellstoff-Schicht bedeckt wurden. Eine aufgelegte, beschwerte Glasplatte gewährleistete einen gleichmäßigen Transfer. Es wurde mindestens 24 Stunden geblottet. Der Blot-Vorgang wurde durch Ethidiumbromid-Färbung des Geles kontrolliert. Zum Fixieren der DNS auf den Filter, wurde die zwischen trockenem Whatman-Papier gelagerte Nylon-Membran für eine Stunde bei 80°C in einem Vacuumofen "gebacken". Bis zur weiteren Verarbeitung wurde diese in Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt .

10 x SSC: 1,5M NaCl, 0,15M Na-Citrat; pH 7,2
Denaturierungs-Puffer: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH
Neutralisations-Puffer: 1,5M NaCl, 1M Tris/HCl; pH 7,4

3.16 DNS-Markierung mit radioaktivem Phosphat

Zur Markierung neu synthetisierter Hybridisierungs-Sonden diente die 'random primed' DNS-Markierungsreaktion. Hierbei hybridisieren Hexanucleotide aller möglichen Sequenzkombinationen unspezifisch und in statistischer Verteilung an die eingesetzte DNS-Matrix. Diese 'random Oligonukleotide' dienen als Primer für die Synthese eines neuen, komplementären DNS-Einzelstranges. Die Synthese wird katalysiert durch das Klenow-Fragment der E. coli DNS-Polymerase I, welches ein 76kd großes, durch Protease von *Bacillus subtilis* von der DNS-Polymerase I abgespaltenes Enzym darstellt (Kornberg 1969). Dieses Enzym katalysiert die Addition von Mononukleotiden. Die DNS-Synthetisierung verläuft von den 3'-Enden der 'random primer' unter Einbau hinzugefügter, radioaktiv modifizierter Desoxyribo-nucleosidtriphosphate (Feinberg und Vogelstein 1983).

Die Durchführung der Markierungsreaktion erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend. Auf 9µl Probenvolumen aufgefüllte DNS, in der Menge von 25-50ng, wurden durch zehnminütiges Erhitzen auf 100°C und anschließendes Abkühlen auf Eis denaturiert. Je 1µl dATP, dGTP, dTTP sowie 2µl Reaktionsgemisch, 1µl Klenow-Enzym und 5µl [α -³²P]dCTP, entsprechend 50 µCi bei einer Ausgangskonzentration von 3000 Ci/mmol, wurden hinzugefügt. Nach Durchmischung wurde der Ansatz bei 37°C für 60 Minuten inkubiert, und anschließend die Reaktion durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt. Nicht eingebaute Desoxyribonucleosidtriphosphate wurden durch Zentrifugation in einer vorher präparierten Sephadex-G 50 Chromatographiesäule abgetrennt. Der Markierungseinbau wurde durch Vergleich von gesamt eingesetzter Radioaktivität mit einem Aliquot der inkorporierten Radioaktivität kontrolliert. Der markierte DNS-Strang wurde anschließend zur Hybridisierung weiterverwendet.

3.17 DNS-Hybridisierung

Radioaktiv markierte DNS-Sonden können unter geeigneten chemischen und thermischen Bedingungen an linear vorliegende und auf Membranfilter fixierte DNS binden. Diese Hybride werden später durch Autoradiographie sichtbar.

Um unspezifische DNS-Bindungsstellen auf der Membran abzublocken, wurde die Praehybridisierung durchgeführt. Hierfür wurde die befeuchtete Membran in einen Glaszylinder aufgerollt und mit 15 ml Praehybridisierungs-Lösung, unter Zugabe vorher denaturierter und fragmentierter Lachs-Sperma-DNS, über zwei Stunden bei 61°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde eine neue Hybridisierungs-Lösung, die die radioaktiv markierte DNS-Sonde enthielt, hinzugegeben. Vor der Zugabe wurde die DNS-Sonde zusammen mit 150µl Lachs-Sperma-DNS (10 µg/µl) gekocht und auf Eis plaziert, damit sie in Einzelsträngen vorliegt. Unter ständigem Drehen der Glasröhre wurde die Hybridisierung über 12-16 Stunden bei 61°C durchgeführt. Unspezifisch an die Membran gebundene DNS wurde durch mehrmaliges Waschen des Filters unter steigender Stringenz, d.h. abfallender ionischer Konzentration, entfernt. Dabei wurde die Membran zweimal zehn Minuten in 2xSSC bei Raumtemperatur, fünf Minuten in 1XSSC + 1% SDS und zwanzig Minuten bei 50°C in 0,1XSSC + 0,1% SDS unter kräftiger Schüttelbewegung gewaschen. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wurde nach jedem Waschvorgang mit dem Geigerzähler kontrolliert. Um die Membran vor dem Austrocknen zu bewahren, wurde sie gleich nach dem Waschen in Plastikfolie eingeschweißt und zur Autoradiographie weiterverwendet.

Praehybridisierungs-Lösung:

6xSSC, 0,5 SDS, 5x und Denhardt-Lösung, 100µg/µl fragmentierte denaturierte Lachs-Sperma-DNS

1 x Denhardt-Lösung:

0,02% Ficoll, 0,02% Rinderserum-Albumin, 0,02% Poly-vinyl-pyrrolidon

20 x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat

3.18 Autoradiographie

Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiven Probe können Hybride durch Autoradiographie visualisiert werden. Die Membranen wurden innerhalb einer Kodak Film-cassette mit Verstärkerfolien auf einen Röntgenfilm gelegt und bei -80°C für ein bis sechs Tage exponiert. Die Größe der markierten DNS-Fragmente kann ermittelt werden durch Vergleich mit dem Molekularmassenstandard im photographierten Elektrophorese-Agarosegel .

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung eines Assays aus Langzeitflüssigkultur und DNS-Filterhybridisierung zum Nachweis von minimaler Restkrankheit

4.1.1 Sensitivität der DNS-Filterhybridisierung zum Nachweis von Monoklonalität

In einem Verdünnungsexperiment mit aus Burkitt-Lymphomzellen der Zell-Linie Raji extrahierter DNS und Plazenta-DNS wurde die Sensitivität der Filter-Hybridisierung getestet. Hierbei wurde die DNS der Raji-Zellen bis zu einem Minimum-Anteil von 1% der Plazenta-DNS beigemischt. Die absolute Menge an DNS betrug bei jedem Ansatz jeweils 20µg. Dann erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und HindIII. Anschließend wurde das DNS-Gemisch in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf einen Filter übertragen und mit der radioaktiv markierten JH-Sonde hybridisiert. Die Autoradiografie der Filter zeigte monoklonale Signale bei 1,6 Kb bis zu einer Verdünnung von 2,5% (Abb. 4.1 a und b, S.36).

Abb. 4.1a

DNS-Filterhybridisierung mit der JH-Sonde. Verdünnungsreihe von gesunden mononukleären Knochenmarkszellen mit Burkitt-Lymphomzellen der Zelllinie Raji.

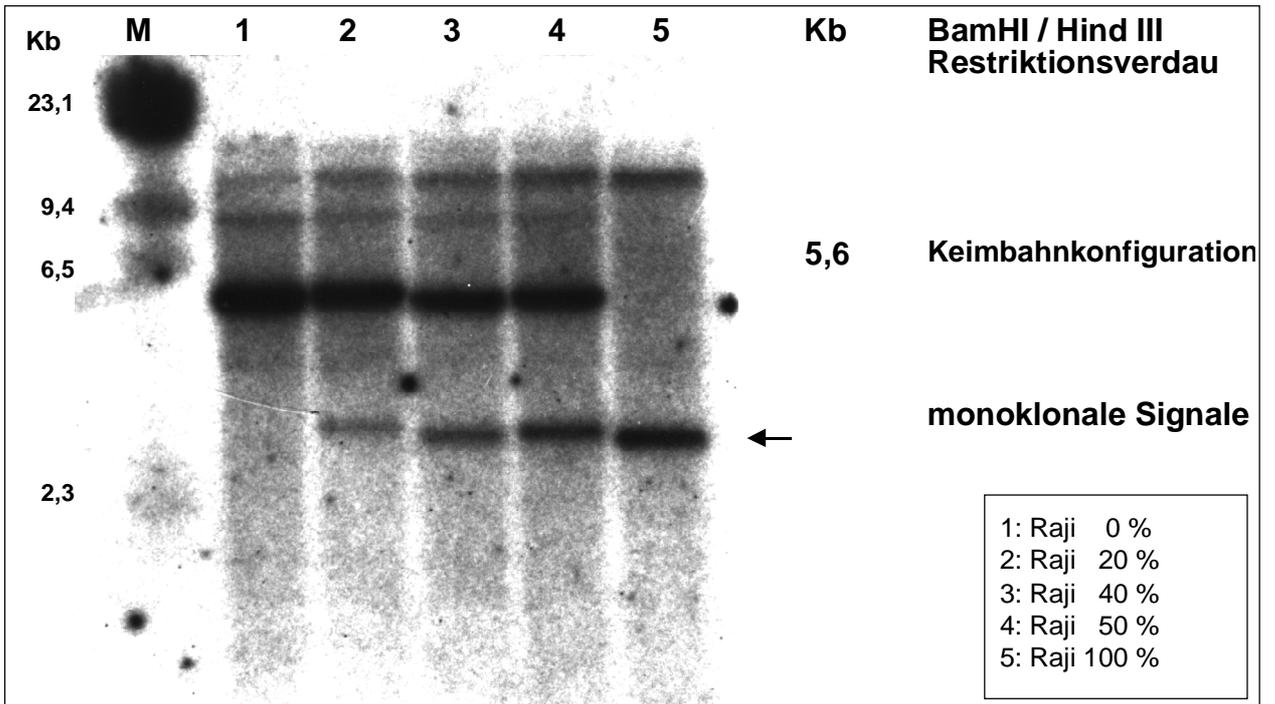
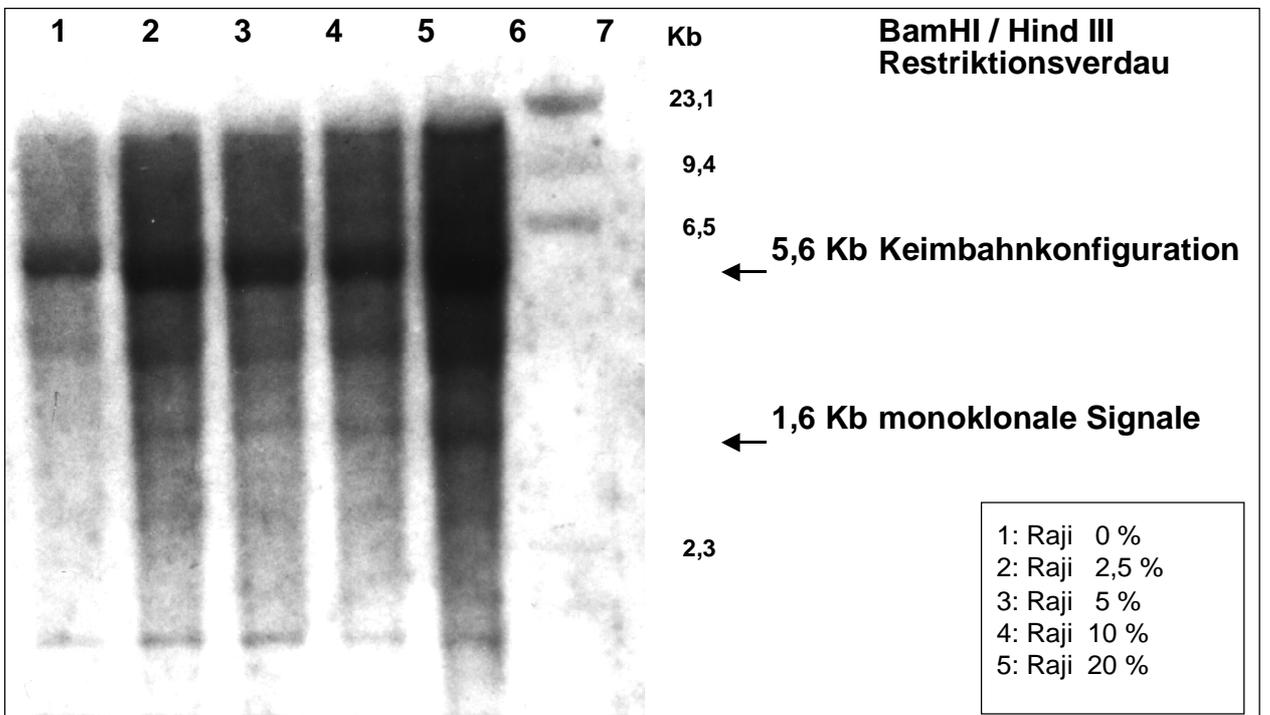


Abb. 4.1b



Die Nachweisgrenze eines monoklonalen Rearrangements lag bei 2,5%

4.1.2 Sensitivität des lichtmikroskopischen Nachweises von Burkitt-Lymphomzellen in normalen mononukleären KM Zellen

Burkitt-Lymphomzellen der Zelllinie Raji wurden mit mononukleären KM-Zellen gesunder Spender in Verdünnungen bis $1:10^6$ gemischt. Anschließend wurden Zytozentrifugat-Präparate angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. In der lichtmikroskopischen Analyse wurden Burkitt-Lymphom-Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:100 entdeckt. Hierbei sei erwähnt, dass die typische Morphologie der Burkitt-Lymphom-Zellen eine wesentliche Erleichterung in der mikroskopischen Analyse darstellte, im Gegensatz zu der deutlich problematischeren Einordnung pathologisch veränderter Zellen im Untersuchungsgut bei Patienten mit Erkrankungen aus dem hämatologischen Formenkreis.

4.1.3 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Burkitt-Lymphom-Zellen (Zelllinie Raji) der B-Reihe und gesunden mononukleären KM-Zellen

Es wurden insgesamt 10^6 Zellen in 10ml Kulturmedium gebracht. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis $1:10^6$ Raji-Tumorzellen in gesunden KM-Zellen hergestellt. Nach jeder Woche wurde jeweils die Hälfte der Zellsuspension entfernt und die Kultur mit dem gleichem Volumen Zellmedium aufgefüllt. Die entnommenen Zellen wurden quantifiziert. Darüberhinaus wurden 2 Zytozentrifugate angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. In der anschließenden mikroskopischen Analyse wurden Zellkulturen, in denen Tumorzellen vorkamen, als positiv gewertet. Hierbei waren die Burkitt-Lymphomzellen sicher zu identifizieren anhand ihrer typischen Morphologie: rundlicher Zellkern, großer Nukleolus sowie basophiles Zytoplasma mit kleinen Fettvakuolen. Wie in Tabelle 4.1, S.38/39 dargestellt zeigte sich, dass in der konventionellen mikroskopischen Analyse nach Pappenheim-Färbung Raji-Tumorzellen in einer Verdünnung $1:10^6$ bereits nach 3 Wochen Flüssigkultur, in der DNS-Filterhybridisierung nach 5 Wochen nachweisbar waren (Abb. 4.2, S.43).

Tab. 4.1 Langzeitkultivierung der Verdünnungsreihe von Raji-Lymphomzellen**Raji 1:10**

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	1,1	20,0	+	+
2	1,8	4,5	+	k.S.
3	2,0	12,5	+	+
4	2,0	20,0	+	+
5	1,8	20,0	+	+
6	1,9	8,8	+	+

Raji 1:10²

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,5	10,0	+	-
2	0,8	10,8	+	+
3	2,2	15,0	+	+
4	2,6	20,0	+	+
5	2,2	19,5	+	+
6	1,8	12,4	+	+

Raji 1:10³

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,55	13,5	-	-
2	0,46	7,6	+	-
3	1,2	11,4	+	+
4	2,7	18,7	+	+
5	2,4	21,2	+	+
6	2,1	12,0	+	+

Fortsetzung Tab. 4.1

Raji 1:10⁴

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,62	12,2	-	-
2	0,36	2,4	+	-
3	0,28	4,2	+	-
4	0,17	15	+	+
5	0,29	20,5	+	+
6	0,25	22,7	+	+

Raji 1:10⁵

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,81	13,2	-	-
2	0,48	13,4	-	-
3	0,11	3,6	+	k.S.
4	0,26	5,4	+	-
5	2,1	18,7	+	+
6	3,6	14,4	+	+

Raji 1:10⁶

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,49	4,0	-	-
2	0,33	4,0	-	-
3	0,07	2,2	+	k.S.
4	0,12	3,0	+	k.S.
5	0,65	20,0	+	+
6	3,1	15,5	+	+

k.S.= kein Signal

4.1.4 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Burkitt-Lymphomzellen der B-Reihe (Zelllinie ST486) und gesunden mononukleären KM-Zellen

Wie bei der Langzeitkultivierung der Raji-Zellkultur-Linie wurden Zellen der B-Lymphomzellen ST486 in Verdünnungen bis $1:10^6$ mit mononukleären Zellen gesunder Spender in Kultur gebracht. Hierbei fiel ein weniger starkes Wachstum der ST486-Tumorzellen auf, so dass die Möglichkeit des Vergleiches von stark proliferierenden mit weniger stark proliferierenden Lymphomzellen bezüglich des Lymphomnachweises bestand. Aufgrund der geringen Menge isolierter DNS nach wöchentlicher Entnahme jeweils der Hälfte des Kulturvolumens wurde ein Pool der gewonnenen Zell-DNS in vertikaler Richtung der jeweiligen Verdünnungsansätze gebildet. Die DNS-Hybridisierungen mit der JH-Sonde ergaben den Nachweis von Monoklonalität bis zu der maximalen Verdünnung von einer Tumorzelle in 1 Million mononukleären KM-Zellen (Abb. 4.3, S.43). Dieses Ergebnis entsprach auch der morphologischen Untersuchung. Tab.4.2, S.41/42 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 4.2 Langzeitkultivierung der Verdünnungsreihe von ST486-Lymphomzellen

ST486 1:10

Woche	Zellzahl 10 ⁶ /ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	4,9	18,3	+	vertikale
2	2,1	8,0	+	Pool-Bildung
3	1,6	8,3	+	
4	0,8	7,1	+	↓
5	0,5	4,5	+	
6	1,3	12,5	+	+

ST486 1:10²

Woche	Zellzahl 10 ⁶ /ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	6,1	5,2	-	vertikale
2	0,49	6,3	+	Pool-Bildung
3	0,2	5,2	+	
4	0,16	6,2	+	↓
5	0,09	6	+	
6	0,2	7	+	+

ST486 1:10³

Woche	Zellzahl 10 ⁶ /ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,47	6,7	-	vertikaler
2	0,26	9,0	-	Pool
3	0,13	5,2	-	
4	0,078	3,7	+	↓
5	0,043	6,0	+	
6	0,058	3,0	+	+

Fortsetzung Tab. 4.2

ST486 1:10⁴

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,83	16,2	-	vertikaler
2	0,25	12,7	-	Pool
3	0,15	3,7	-	
4	0,07	5,6	+	↓
5	0,037	7,0	-	
6	0,075	3,0	+	+

ST486 1:10⁵

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,78	10,9	-	vertikaler
2	0,24	4,1	-	Pool
3	0,13	7,5	-	
4	0,07	8,7	+	↓
5	0,045	7,0	+	
6	0,07	3,0	+	+

ST486 1:10⁶

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,25	8,5	-	vertikaler
2	0,21	11,6	-	Pool
3	0,14	4,3	-	
4	0,066	3,0	-	↓
5	0,04	7,0	+	
6	0,057	3,2	+	+

Abb. 4.2

DNS-Filterhybridisierung. Detektion monoklonaler Signale mit der JH-Sonde nach 5 Wochen Langzeitkultivierung von unterschiedlichen Verdünnungen von Raji-Lymphomzellen in mononukleären KM-Zellen. Bis zu einer Verdünnung von 1: 10⁶ konnten Tumorzellen detektiert werden.

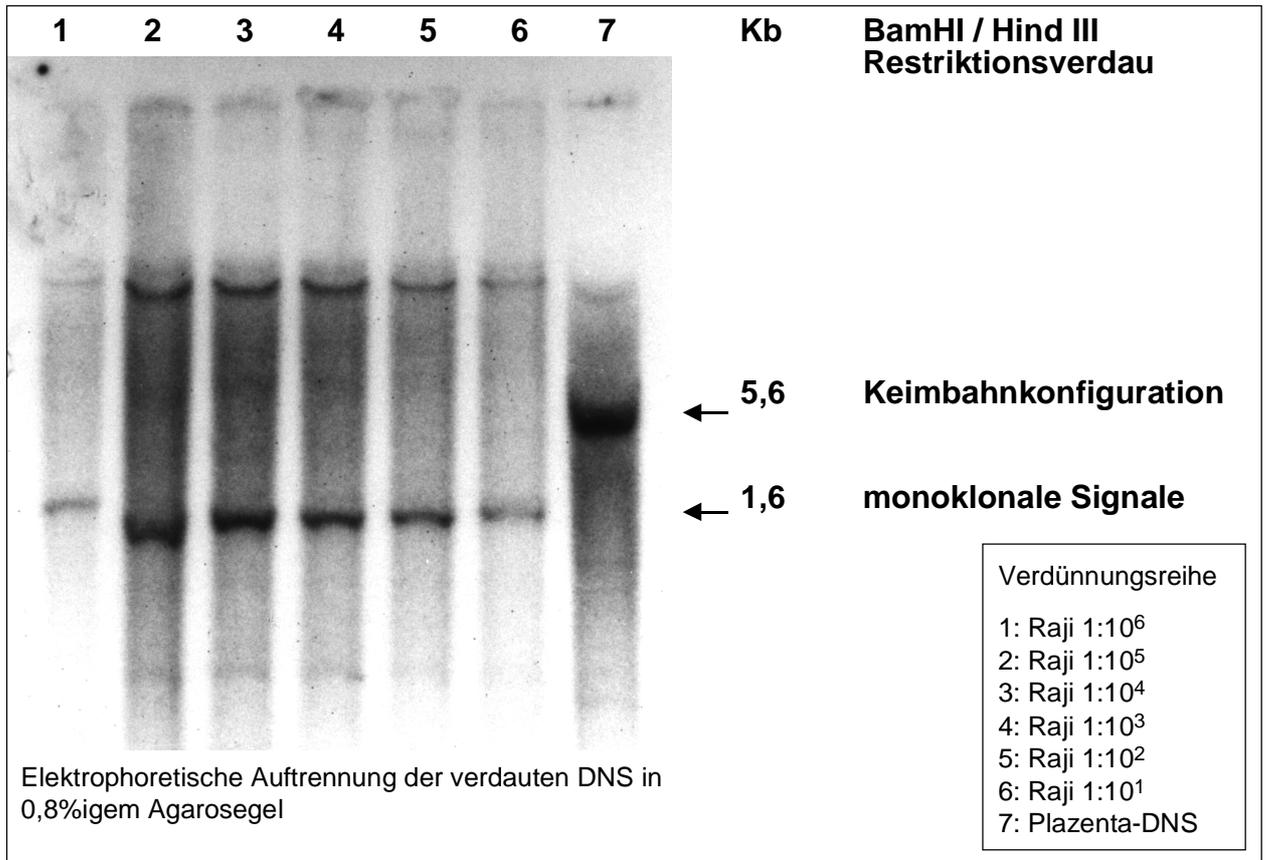
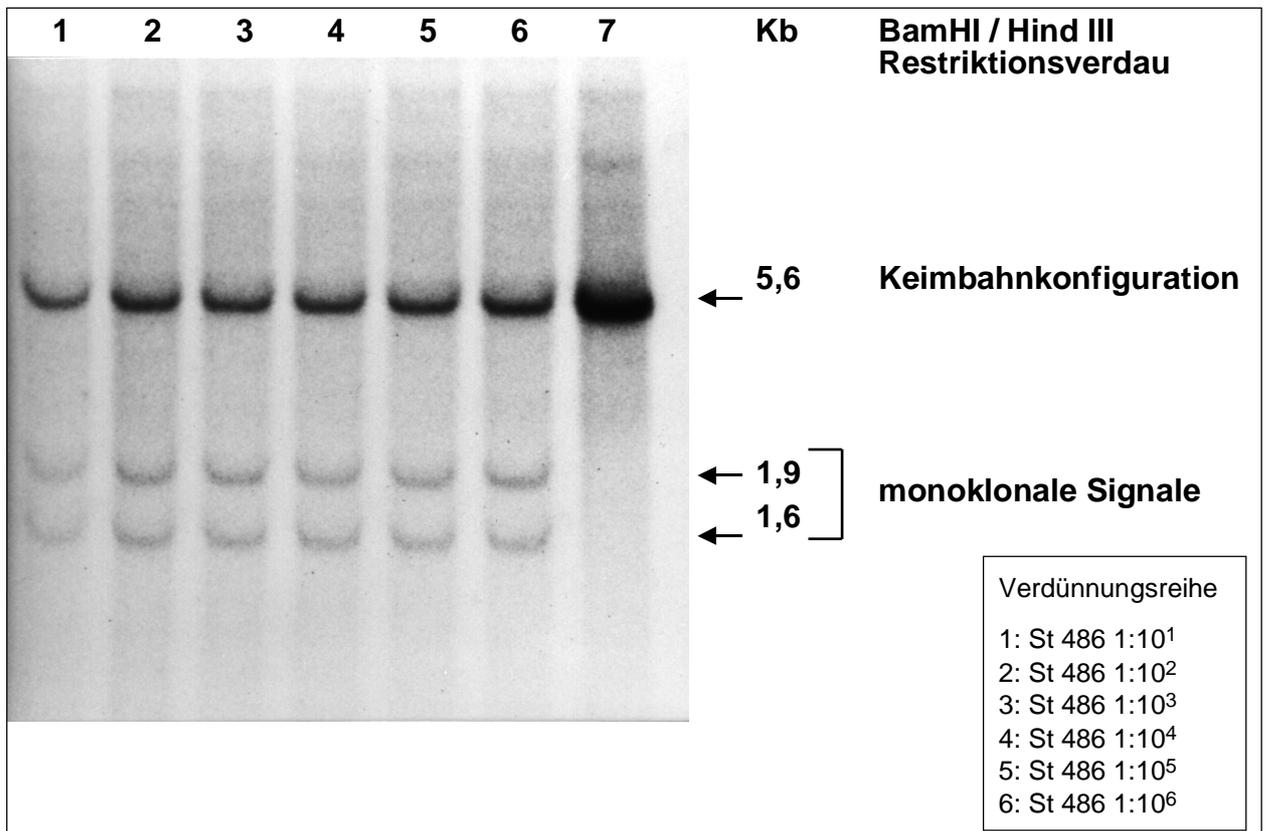


Abb. 4.3

Nach 6 Wochen Langzeitflüssigkultur wurde aus ST486 B-Lymphomzell-Verdünnungen in vertikaler Richtung jeweils ein Pool der DNS gebildet. In allen Verdünnungsexperimenten konnte Monoklonalität in der DNS-Filterhybridisierung nachgewiesen werden.



4.1.5 Langzeitkultivierung: Verdünnungsexperiment mit Lymphom-Zellen der T-Reihe (Zelllinie Molt3) und gesunden mononukleären KM-Zellen

Entsprechend den Ansätzen bei den B-Lymphomzellen wurde auch mit der T-Zell-Lymphom-Kulturlinie Molt3 verfahren. Auch hier gelang nach 6 Wochen Langzeitkultivierung sowohl durch mikroskopische Analyse als auch durch DNS-Filter-Hybridisierung der Nachweis von einer Lymphomzelle in einer Million mononukleären KM-Zellen (Abb. 4.4 u. 4.5, S.47). Tab 4.3, S.45/46 stellt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Nachweisverfahren der jeweiligen Verdünnungsstufen nach in-vitro Kultivierung dar.

Tab. 4.3 Langzeitkultivierung der Verdünnungsreihe von Molt3-Lymphomzellen**Molt3 1:10**

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	2,2	12,0	+	+
2	2,7	27,0	+	+
3	1,7	9,2	+	n.d.
4	1,8	15,5	+	+
5	1,6	25,0	+	+
6	1,7	25,0	+	+

Molt3 1:10²

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,93	4,8	-	-
2	2,5	7,5	+	-
3	1,1	9,2	+	n.d.
4	1,6	22,5	+	+
5	1,4	22,5	+	+
6	1,6	25,0	+	n.d.

Molt3 1:10³

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,81	8,0	-	-
2	0,96	7,5	+	-
3	0,3	10,2	+	n.d.
4	0,6	11,5	+	+
5	0,58	12,5	+	+
6	1,1	25,0	+	+

Fortsetzung Tab. 4.3

Molt3 1:10⁴

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,8	11,2	+	-
2	0,36	5,5	+	-
3	0,12	6,2	+	n.d.
4	0,089	7,8	+	+
5	0,28	7,8	+	+
6	0,45	20,0	+	+

Molt3 1:10⁵

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,29	12,8	-	-
2	0,3	9,5	-	-
3	0,071	6,0	+	n.d.
4	0,03	4,0	+	k.S.
5	0,027	9,7	+	+
6	0,1	12,0	+	+

Molt3 1:10⁶

Woche	Zellzahl 10⁶/ml	DNS (µg)	Tumorzellen Zytologie	monoklonales Rearrangement
1	0,28	6,4	-	-
2	0,24	4,0	-	k.S.
3	0,06	3,0	n.d.	n.d.
4	0,045	n.d.	-	k.S.
5	0,032	8,0	+	+
6	0,02	5,0	+	+

n.d.= nicht durchgeführt; k.S.= kein Signal

Abb. 4.4

DNS-Filterhybridisierung mit TZR- β -Sonde nach 1 Woche Langzeitkultivierung.

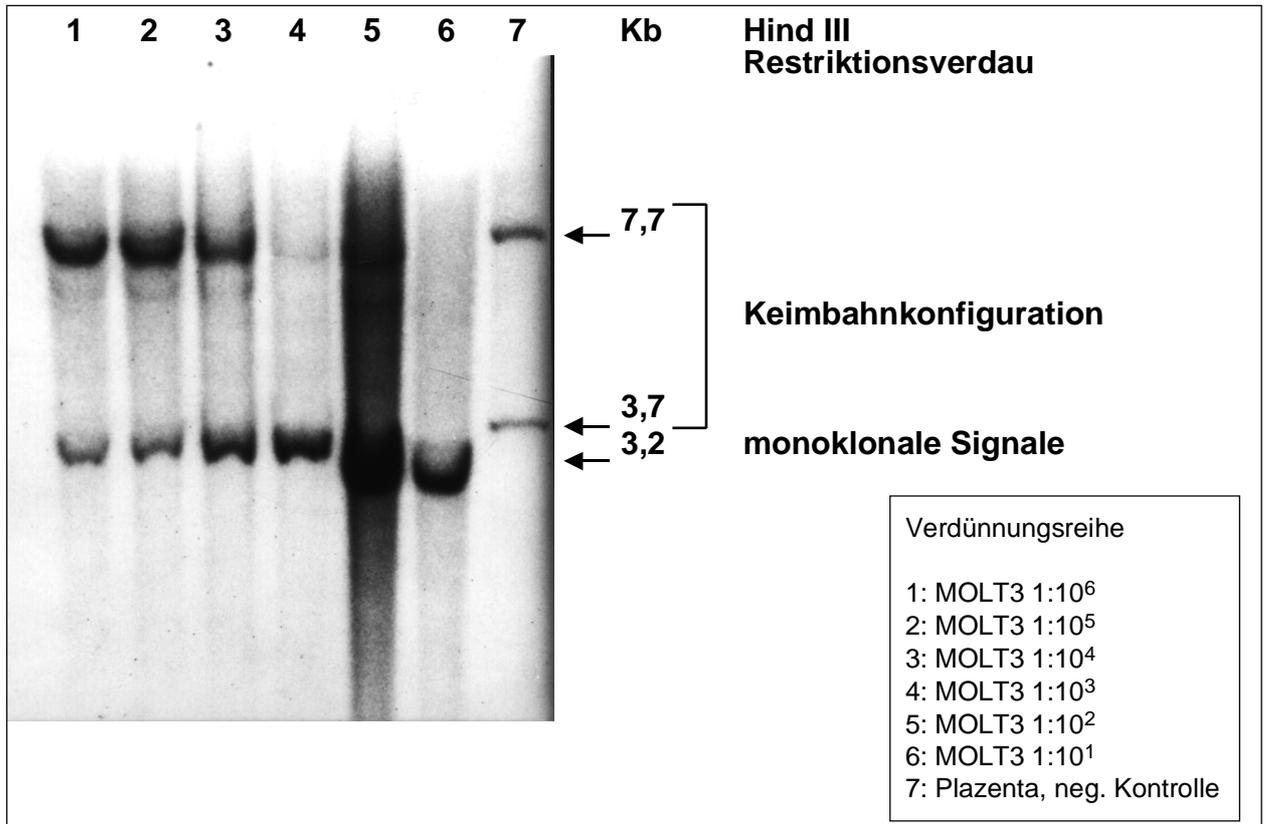
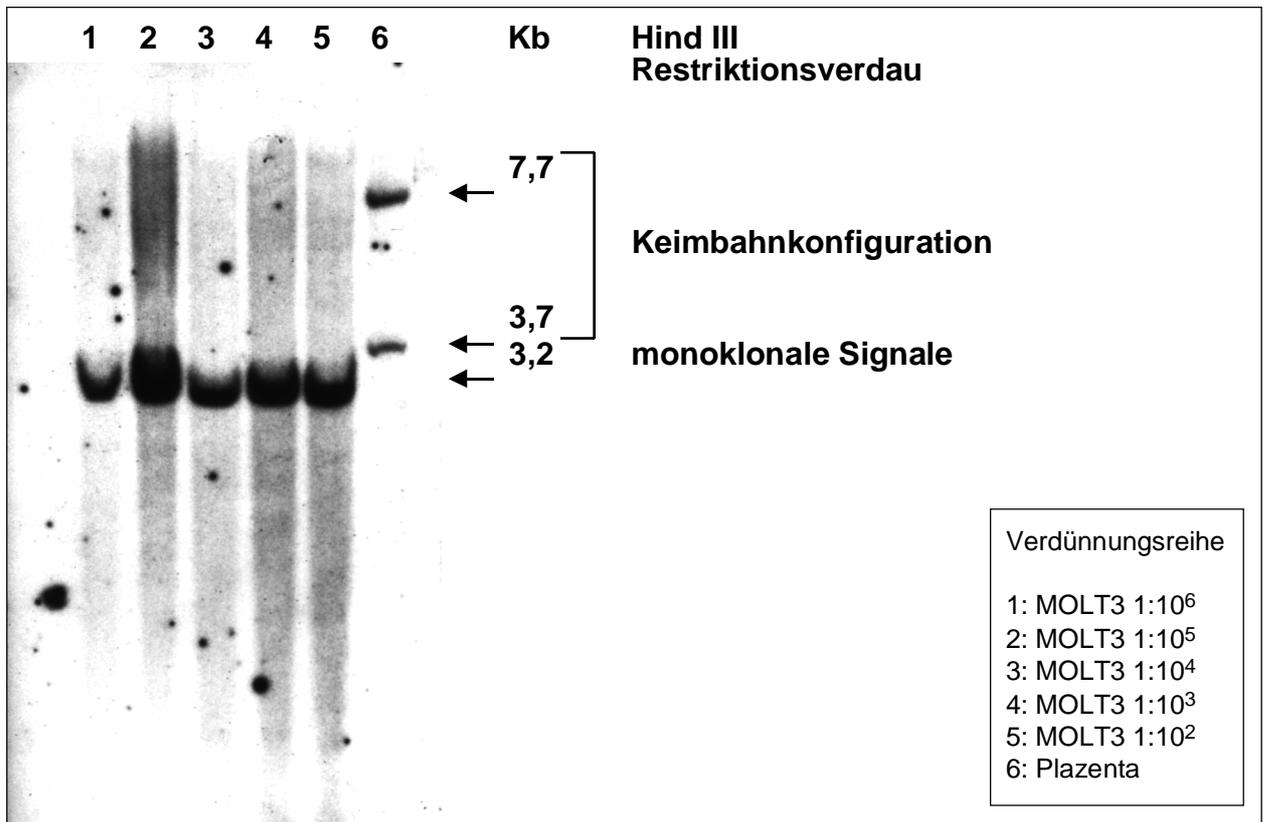


Abb.4.5

DNS-Filterhybridisierung mit TZR- β -Sonde nach Hind III Restriktionsverdau.

Nach 6 Wochen Langzeitkultivierung konnten monoklonale Signale der T-Zell-Lymphom-Zelllinie MOLT3 bis zu einer Verdünnung von 1:10⁶ entdeckt werden.



4.2 Ergebnisse des Assays zum Nachweis von minimaler Restkrankheit nach klinischer Anwendung

4.2.1 Klinische Daten der untersuchten Patienten

Insgesamt wurden 25 Patienten, die an Leukämie oder Lymphome erkrankt waren, untersucht, davon waren 20 B-Zell- und 5 T-Zell-NHL nach Immunophänotypisierung. 10 Frauen und 15 Männer in einem Alter zwischen 8 und 59 wurden in die Studie eingeschlossen. Die Einteilung der NHL erfolgte durch die Begutachtung des Pathologen. Dabei wurde die Einordnung nach der Kieler Klassifikation vorgenommen. Die klinische Stadieneinteilung erfolgte nach Ann Arbor; nur bei dem multiplen Myelom wurde das Stadium der Erkrankung nach Salmon und Durie eingeteilt. In 16 Fällen lag bei Erstdiagnose ein primär extramedullärer Lymphombefall vor. Bei 9 Patienten wurde eine Stammzelltransplantation, bei 8 eine allogene und bei 3 eine autologe Knochenmarktransplantation vorgenommen. 2 Patienten wurden primär operativ versorgt: bei Pat. 20 wurde eine Magenresektion, bei Pat. 23 eine Mediastinalresektion durchgeführt. Tab. 4.4, S.49/50 gibt die klinischen und pathologischen Daten der Patienten wieder.

Tab. 4.4: Klinische und pathologische Daten der untersuchten Patienten

Nr	Name	Alter	G.	NHL	Zytologie	ED	Stadium	KM	Rezidiv	KM	Transpl.	Datum
1	I.Z.	39	m	B	MM,IgG	12/85	III	+	8/94	-	allogene KMT	1/93
2	V.B.	36	w	B	großzellig	1/91	IVa	-	7/91	-	autologe KMT	11/91
3	M.B.	51	w	B	cb	6/90	IVa	-	5/91;5/92	-	PBCST	10/91
4	D.E.	8	m	B	ALL	8/86	IV	+	11/89	+	PBCST	8/92
5	W.E.	46	m	B	cb	8/87	IV	-	2/88;6/89;10/91	-	PBCST	5/92
6	H.G.	44	w	B	cc	4/92	IIIa	-	4/90;1/91;7/91	-	PBCST	4/93
7	R.G.	58	m	B	cb	4/92	IVa	-	kein	-	allogene KMT	7/92
8	M.G.	8	w	B	cALL	7/89	IV	+	11/91;9/92	+	allogene KMT	3/92
9	R.G.	44	w	B	ic(lb-pb)	8/87	Ia	-	9/92;12/98	-	keine	
10	J.J.	54	m	B	cbcc(ib)	4/90	IIb	-	1/91;3/91;11/92	+	PBCST	7/92
11	T.J.	21	m	T	MZ	1/91	IIIa(S)	-	kein	-	allogene KMT	7/91
12	M.K.	57	w	B	Ib;Burkitt	1/92	II	-	11/92	+	autologe KMT	5/92
13	W.K.	31	m	B	Burkitt	7/91	IV	-	10/92	-	keine	
14	B.L.	45	m	B	MM,IgA	12/89		-	8/90	+	allogene KMT	2/92
15	A.L.	32	m	T	pleomorph	10/90	IIb(E)	-	8/91;4/92;8/92;1/93	-	PBCST	2/93
16	U.L.	28	w	T	cb (ALL)	7/91	IVa	+	1/92	+	allogene KMT	2/92
17	H.N.	58	w	B	cb	7/92	IVb	?	12/92;5/93	-	keine	
18	M.O.	38	m	B	MM (anapl.)	9/91	IIIa	+	kein	-	allogene KMT	12/91
19	I.S.	37	w	B	cbcc	1/89	IVa	+	kein	-	allogene KMT	10/90
20	L.S.	59	w	B	MALT	5/92	I(E)	-	kein	-	keine	
21	J.S.	35	m	T	niedrig-hochmaligne	12/91	IVb	+	5/92	-	PBCST	7/92
22	G.T.	50	m	B	MM	10/91	III	+	8/92	+	PBCST	10/92; 1/93
23	J.T.	50	m	T	Ib	4/92	II	-	kein	-	keine	
24	R.W.	20	m	B	Burkitt-ALL	8/91	IV	+	kein	-	autologe KMT	11/91
25	F.W.	41	m	B	ic	6/87	IVa	-	12/88;7/92;3/95;4/97	-	PBCST	2/93

G.= Geschlecht; NHL= Non-Hodgkin-Lymphom; MM= Multiples Myelom; KM= Knochenmarkinfiltration; Stadieneinteilung bei NHL nach Ann Arbor, bei MM nach Salmon und Durie; cb= zentroblastisch; cc= centrozytisch; ic= immunocyfisch; lb= lymphoblastisch; MALT= Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe; m= männlich; w= weiblich; KMT= Knochenmarkstransplantation; PBCST= Stammzelltransplantation

4.2.2 Nachweis von minimaler Restkrankheit bei den untersuchten Patienten

Entsprechend den oben beschriebenen Kulturverfahren wurden die mononukleären Zellen aus Leukapherese-Material und Knochenmark isoliert und für 6 Wochen in Flüssigkultur gebracht. Bei allen Patienten wurde ein jeweils vertikaler Pool der wöchentlich entnommenen Zellen gebildet und die DNS extrahiert. Anschließend wurden DNS-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die B-Zell-Lymphome mit der JH-Sonde und die T-Zell-Lymphome mit der TZR-Sonde hybridisiert. Insgesamt wurde bei 4 von 25 Patienten minimale Restkrankheit entdeckt, bei 3 Patienten mit B-Zell- (Abb. 4.6a und b, S.52) und bei einem Patienten mit T-Zell-NHL (Abb. 4.7, S.53).

4.2.3 Korrelation der Testergebnisse mit dem klinischem Verlauf

Von den innerhalb von 6 Jahren Beobachtungszeit verstorbenen Patienten wurden 4 von 12 positiv getestet in dem hier angewendeten Assay (Tab. 4.5, S.54). Nach klinischen Kriterien lag bei den positiv getesteten jeweils ein Rezidiv der Lymphomerkran-
kung vor. Die Überlebenszeiten dieser Patienten nach Testung betrugen 1, 5, 6 und 11 Monate. 8 Patienten verstarben an einem Rezidiv, ohne dass ein positives Testergebnis vorlag. Dabei lagen in 3 Fällen jedoch lange Überlebenszeiten vor: 18 Monate (Pat. 1), 29 Monate (Pat. 8); 65 Monate (Pat. 25). In 2 weiteren Fällen wurde nicht KM, sondern Leukapherese-Material untersucht. 2 weitere Patienten verstarben nicht an einem Rezi-
div: Pat. 14 verstarb im Rahmen eines infektiös-toxischen Geschehens in respiratori-
scher Insuffizienz 1 Monat nach allogener KMT nach intensivmedizinischer Behand-
lung. Pat. 18 verstarb ebenfalls nach allogener KMT durch eine Sepsis bei akuter Spen-
der-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD).

Abb.4.6a

DNS-Filterhybridisierung mit der JH-Sonde nach Langzeitkultivierung der aus Knochenmark (KM) und Leukapherese (LP) gewonnenen mononukleären Zellen der Patienten.

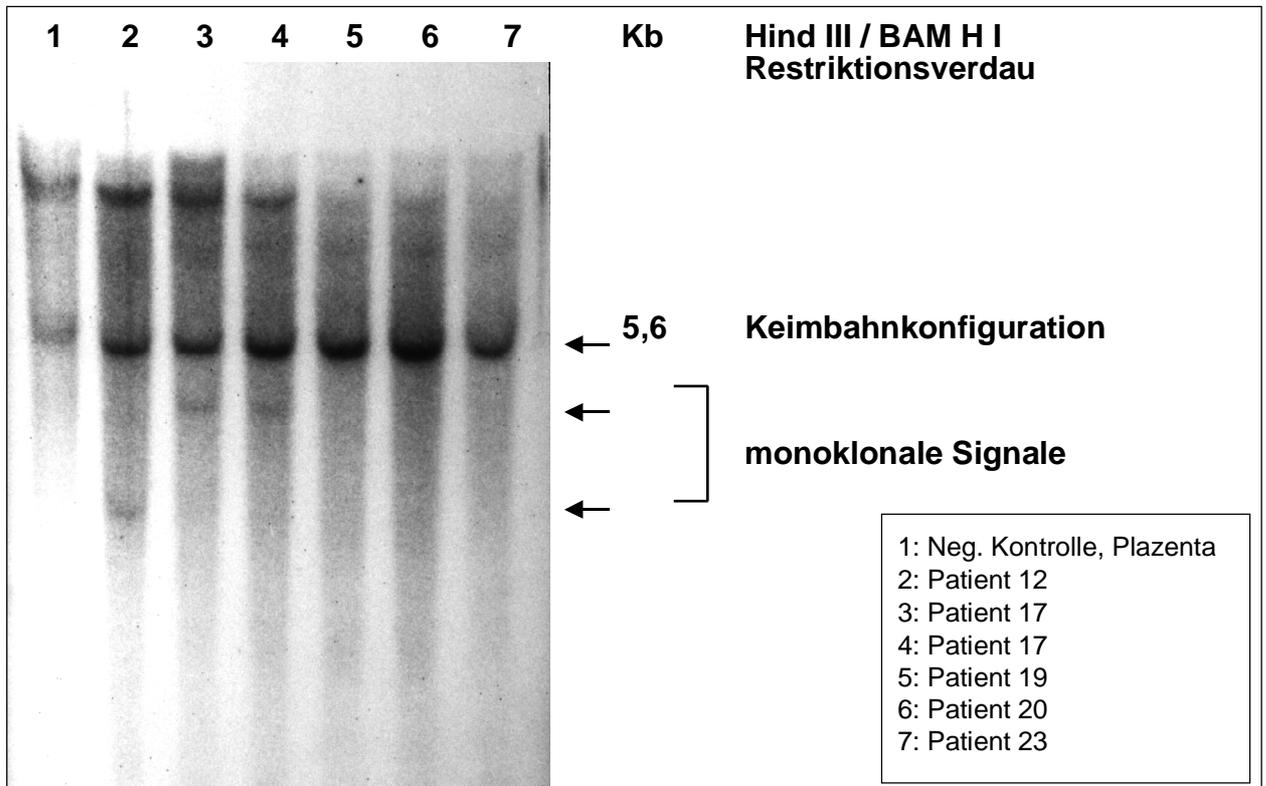
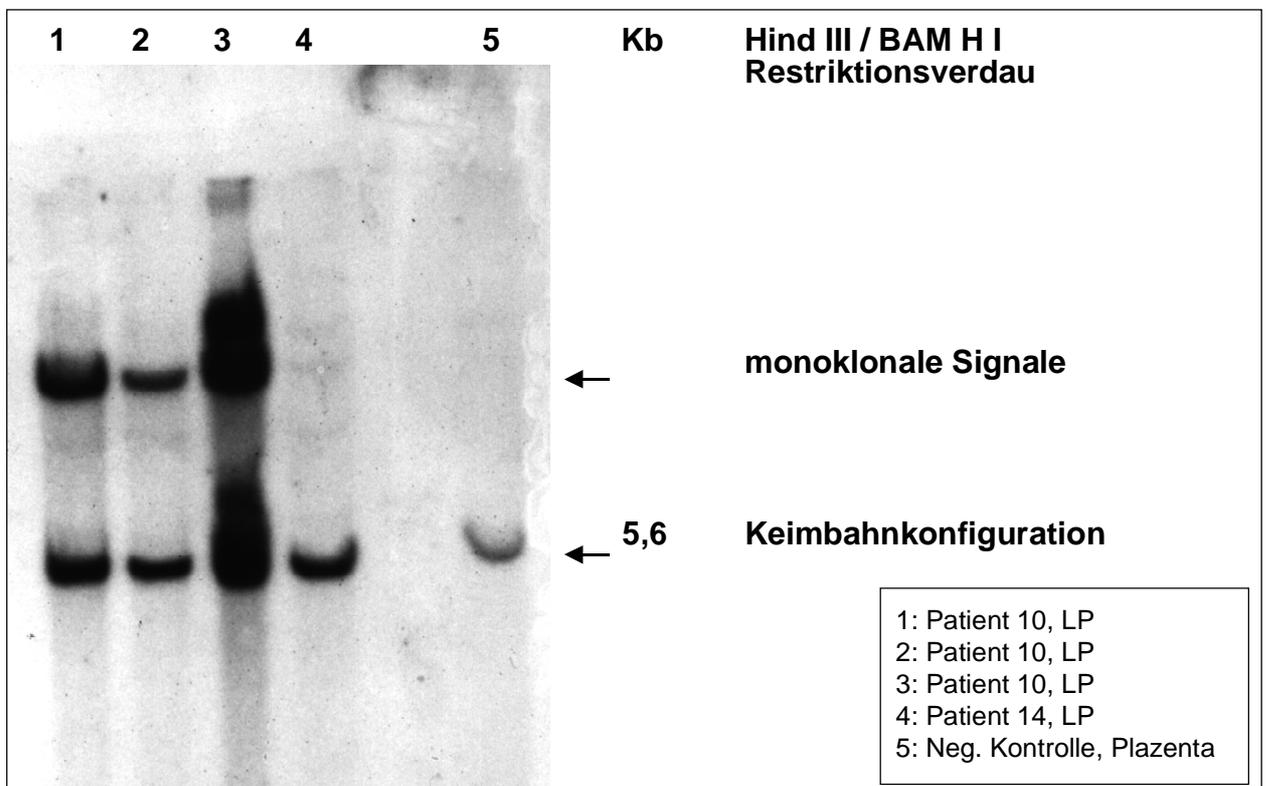


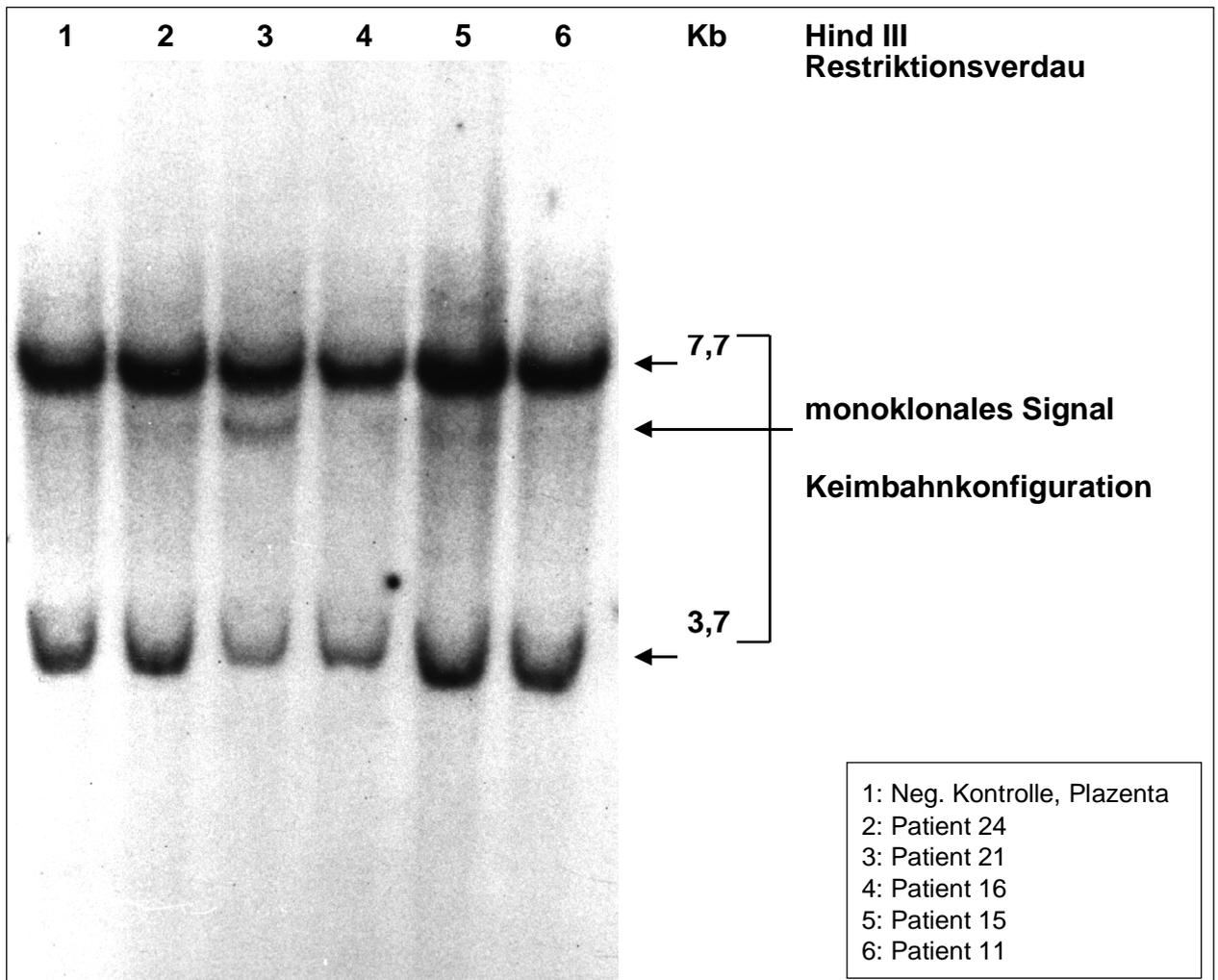
Abb.4.6b

DNS-Filterhybridisierung mit der JH-Sonde.



Bei den Patienten 10, 12 und 17 konnten monoklonale Immunglobulinen-Rearrangements detektiert werden.

Abb.4.7
DNS-Filterhybridisierung mit der TZR-Sonde.



Bei Patient 21 konnte ein monoklonales Rearrangement des T-Zellrezeptorgens entdeckt werden.

Tab. 4.5: Ergebnisse des Nachweises von minimaler Restkrankheit und Überlebenszeit:
Verstorbene Patienten

Pat.	KMP	Zytol.	Kultur-Material	Datum	Testzeitpunkt; Monate	MRK	ÜLZ*; Monate	Todes- ursache
1	8/94	+	KM	2/93	1 post Transpl.	-	18	Rezidiv/ Sepsis
3	9/91	-	LP	9/91	1 prae Transpl.	-	8	Rezidiv
5	9/91	-	KM	6/92	1 post Transpl.	-	7	Rezidiv
8	7/92	-	KM	6/92	3 post Transpl.	-	29	Rezidiv
10	3/92	-	KM;LP	7/92	0,5 prae Transpl.	+	5	Rezidiv
12	4/92	-	KM	4/92	1 prae Transpl.	+	11	Rezidiv
13	4/92	-	LP	4/92	7 post Induktionsth.	-	6	Rezidiv
14	2/92	-	KM	2/92	0,5 post Transpl.	-	1	Respir. Versagen
17	1/93	-	KM	12/92	0,5 post Induktionsth.	+	6	Rezidiv
18	3/92	-	KM;PB	3/92	3 post Transpl.	-	1	GvHD/ Sepsis
21	7/92	-	KM	7/92	0,5 prae Transpl.	+	1	Rezidiv
25	5/98	-	LP	1/93	0,5 prae Transpl.	-	65	Rezidiv

LP= Leukapherese; KM= Knochenmark

KMP= Knochenmarkpunktion; Zytol.= Zytologisch-morphologischer Lymphomnachweis; MRK= Nachweis von minimaler Restkrankheit durch die Assay-Untersuchung

*ÜLZ= Überlebenszeit nach Datum der Assay-Untersuchung (Langzeitflüssigkultur);

Tab. 4.6: Ergebnisse des Nachweises von minimaler Restkrankheit und Überlebenszeit:
Lebende Patienten

Pat.	KMP	Zytol.	Kultur- Material	Datum	Testzeitpunkt; Monate	MRK	ÜLZ*; Monate
2	2/92	-	KM	2/92	3 post Transpl.	-	71+
4	8/92	-	LP	8/92	0,5 prae Transpl.	-	65+
6	4/93	-	KM	10/92	6 prae Transpl.	-	63+
7	7/92	-	KM	7/92	0,5 prae Transpl.	-	66+
9	12/97	-	KM	10/92	1 post Induktionsth.	-	63+
11	7/92	-	KM	7/92	12 post Transpl.	-	66+
15	1/93	-	KM	6/92	8 prae Transpl.	-	67+
16	2/92	-	KM	3/92	1 post Transpl.	-	70+
19	4/92	-	KM	4/92	18 post Transpl.	-	69+
20	5/92	-	KM	5/92	bei Erstdiagnose	-	68+
22	4/93	-	KM;LP	1/93	0,5 prae 2. Transpl.	-	60+
23	6/92	-	KM	6/92	1 post Induktionsth.	-	67+
24	5/94	-	KM	11/91	7 post Transpl.	-	74+

*ÜLZ= Überlebenszeit nach Datum der Assay-Untersuchung (Langzeitflüssigkultur); LP= Leukapherese; KM= Knochenmark

KMP= Knochenmarkpunktion; Zytol.= Zytologisch-morphologischer Lymphomnachweis; MRK= Nachweis von minimaler Restkrankheit durch die Assay-Untersuchung

Nach über 5 Jahren waren noch 13 von 25 Patienten am Leben. Dabei ergab sich bis zu diesem Zeitraum kein Hinweis für ein Rezidiv. Keiner von diesen Patienten hatte eine positive Testung mit dem hier angewandten Assay (Tab 4.6, S.55).

4.2.4 Prädiktiv-Werte des Assays

Alle positiv getesteten Patienten erlitten ein Rezidiv, so dass der positive Prädiktiv-Wert 100% beträgt (Tab 4.7).

Tab. 4.7: Prädiktive Werte der Assay-Untersuchung hinsichtlich eines Rezidives bei positivem Assay

NHL	Anzahl	Assay-positiv	Rezidiv	Positiver Prädiktiv-Wert
B	20	3	3	100%
T	5	1	1	100%
Total	25	4	4	100%

Bei den 21 negativ getesteten Patienten von insgesamt 25 kam es innerhalb eines Zeitraumes von 5 Jahren in 6 Fällen zu einem Rezidiv, 67% der Assay-negativen Patienten hatten also eine 5-Jahres-Überlebenszeit. Ein Jahr nach Testung waren 17 (81%) der Assay-negativen Patienten am Leben. 2 Patienten starben therapiebedingt ohne Hinweise für ein Rezidiv. Insgesamt ergibt sich ein negativer Prädiktiv-Wert von 73% (Tab. 4.8, S.57). Zum Zeitpunkt 1 Jahr nach Assay-Untersuchung zeigte sich lediglich in 3 Fällen von 21 negativ getesteten ein Rezidiv, so dass zu diesem Untersuchungszeitpunkt ein negativer Prädiktiv-Wert von 86% vorgelegen hat.

Tab. 4.8: Prädiktive Werte der Assay-Untersuchung hinsichtlich eines Rezidives bei negativem Assay

NHL	Anzahl	Assay- negativ	Rezidiv	Negativer Prädiktiv-Wert
B	20	17	6	65%
T	5	4	0	100%
Total	25	21	6	71%

4.2.6 Sensitivität und Spezifität des Assays

Die Spezifität bei diesem Assay entspricht 100%, da alle positiv getesteten Patienten ein Rezidiv zeigten. Die Sensitivität lag bei 33%. Ohne die zwei therapiebedingt Verstorbenen, wobei zum Zeitpunkt des Todes kein Hinweis für ein Rezidiv vorlag, betrug die Sensitivität 40%.

4.2.7 Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

In der statistischen Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier betrug das kumulative Überleben der negativ-getesteten Patienten nach 6 Monaten 86% und nach 60 Monaten 67%. Bei den positiv-getesteten ergab sich ein kumulatives Überleben nach 6 Monaten von 25%, innerhalb von 11 Monaten waren alle Patienten an einem Rezidiv verstorben (Abb. 4.8, S.58).

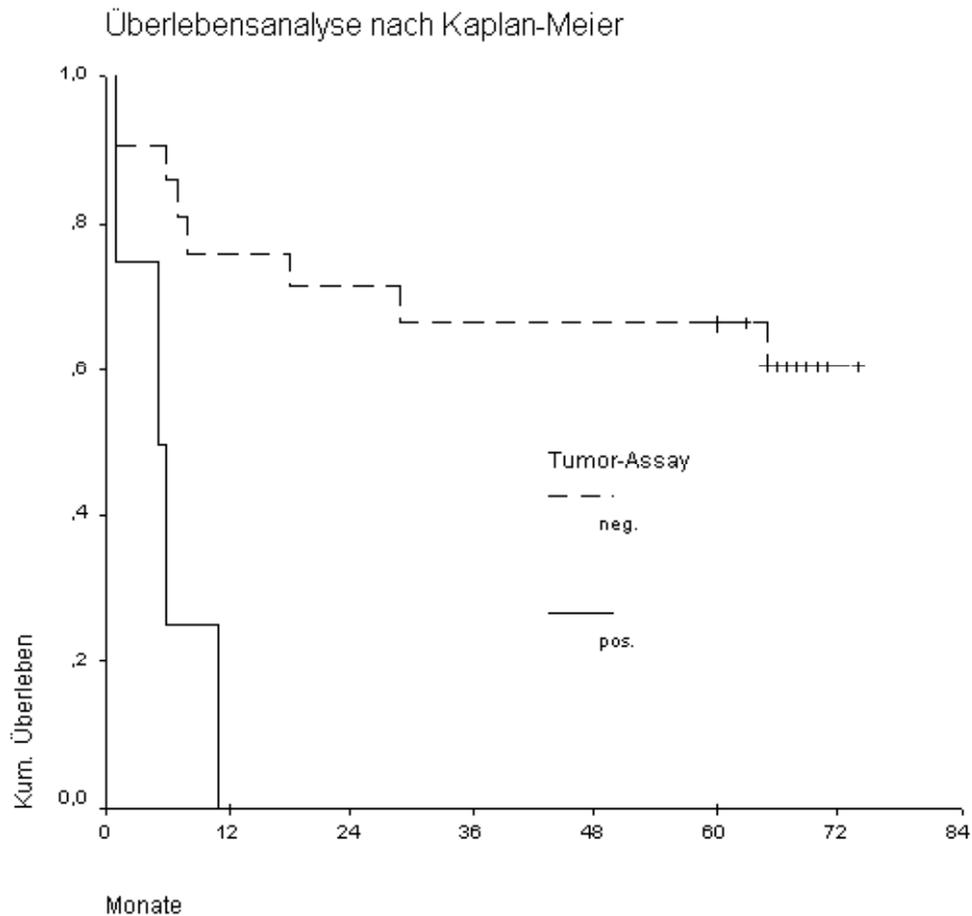


Abb. 4.8 Kumulative Überlebenszeit-Analyse nach Kaplan-Meier der mit dem Tumor-Assay untersuchten Patienten.

Im Vergleich der Testgruppen Tumor-Assay positiv versus Tumor-Assay negativ ergab sich im Log-Rank Test ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0008$). Abb. 4.8 zeigt eine grafische Darstellung der kumulativen Überlebenszeiten der Patienten hinsichtlich Tumor-Assay negativ versus Tumor-Assay positiv.

5. Diskussion

In dieser Studie konnte ein Assay etabliert werden, das eine Sensitivität in der Detektion von malignen lymphoiden Zellen in Knochenmark und peripherer Stammzellkollektion durch ein kombiniertes in-vitro Verfahren aus Langzeitflüssigkultur und Hybridisierungsexperimenten reproduzierbar bis zu einer Tumorzelle in einer Million mononukleären Knochenmarkzellen erreicht. Dabei wurden Knochenmarkzellen gesunder Spender mit Lymphomzellen der B- und T-Zell-Reihe gemischt und nach sechswöchiger Inkubation in einem standardisierten Kulturmedium sowohl morphologisch als auch mittels spezifischer Gensonden hinsichtlich des Vorkommens monoklonaler Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgen-Rearrangements untersucht.

Desweiteren wurde das Verfahren bei der Kultivierung von Knochenmarkzellen- und peripheren Stammzellen an malignen Lymphomen erkrankter Patienten in 25 Fällen eingesetzt. Zur sicheren Identifizierung der malignen lymphatischen Zellen diente die DNS-Filterhybridisierung, da allein morphologische Kriterien am Zytospinpräparat keine sichere Dignitäts-einordnung zuließen. Hierbei zeigten 3 von 20 (15%) der Patienten mit B-Zell-Lymphom und 1 von 5 (20%) der Patienten mit T-Zell-Lymphom okkulte Tumorzellen in dem Knochenmark-Langzeitkultursystem. Dieses konnte in allen Fällen durch gesammelte und gepoolte zelluläre DNS in DNS-Hybridisierungsexperimenten bestätigt werden. In allen 4 Kultur-positiven Fällen entwickelten die Patienten ein Rezidiv, so dass ein positiver Prädiktiv-Wert von 100% bestand. In 6/21 (29%) der Fälle trat bei den Patienten ein Rezidiv auf, ohne dass in dem Kultursystem maligne lymphoide Zellen detektiert werden konnten. 2 Patienten verstarben therapiebedingt und ohne Hinweis für ein Rezidiv innerhalb eines Monats nach jeweils allogener KMT. Falsch-positive Fälle traten nicht auf. Nach einem Zeitraum von 1 Jahr verstarben lediglich 3 von 21 negativ getesteten Patienten (14,3%) an einem Rezidiv. Es muss also davon ausgegangen werden, dass mehrfache Testungen im Rahmen von Verlaufskontrollen notwendig sind, um die Zahl falsch-negativer Ergebnisse zu minimieren. Der Anteil der falsch-negativen Fälle kann am ehesten zurückgeführt werden auf: 1. nicht optimale Wachstumsbedingungen im Kultursystem, insbesondere auch bei Kultivierung der KM-Zellen nach myeloablativer Therapie bei KMT oder Hochdosis-Chemotherapie; auch muss da-

von ausgegangen werden, dass nicht alle Lymphomzellen unter den hier verwendeten Standard-Bedingungen proliferieren; 2. Inhomogene KM-Infiltrationen, wobei Tumorzellen bei der KM-Punktion nicht erfasst werden. So beschrieben Martens und Mitarbeiter in einem Rattenmodell für AML eine Frequenz-Variabilität von leukämischen Zellen innerhalb einer KM-Höhle eines Knochens bei minimaler Restkrankheit von 4 bis 28000 (Martens et al. 1987); 3. Fehlen einer KM-Infiltration und Versterben des Patienten an lokalisiertem Tumorleiden oder an einem nicht rezidiv-bedingtem Leiden, was letztlich nur durch Autopsien zu klären wäre. In dieser Studie lag keine representative Obduktionsfrequenz vor.

Die Entdeckung minimaler maligner, monoklonaler Zellkontamination in Knochenmark und peripherem Blut ist von besonderem klinischem Interesse für die Bewertung der Effizienz von Chemotherapie-Schemata, Prognose und Verlauf der Erkrankung, die frühe Entdeckung eines Rezidivs oder die Quantifizierung verbliebener maligner Zellen in Aspiraten für die autologe Knochenmarktransplantation oder Stammzell-transplantation. Vaughan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass intravenöse Applikation monoklonaler Tumorzellen bei immunsupprimierten Patienten rasch zu einer disseminierten Tumoraussaat führen kann (Vaughan et al. 1987). Die Angaben über die Häufigkeit der Entdeckung minimaler maligner Kontamination bei Lymphom-erkrankungen in morphologisch tumorfreiem Knochenmark sind je nach Detektionsmethode sehr unterschiedlich. Darüberhinaus ist die Wahrscheinlichkeit einer KM-Infiltration natürlich auch von biologischen Variablen abhängig, wie z.B. Lymphomtyp und Erkrankungs-Stadium.

Bisher existieren nur wenige prospektive Studien, die ein mit Zellkultur kombiniertes molekulargenetisches Nachweisverfahren in der Detektion von Mikrometastasen anwenden, wie es in dieser Arbeit vorgestellt wird.

Hingegen finden sich in der Literatur zahlreiche Studien, in denen die Signifikanz nicht kombinierter, singulärer Nachweismethoden untersucht wurden.

Bei der Verwendung immunologischer Methoden wie beispielsweise der Immunfluoreszenz-Histochemie und Durchfluß-Zytometrie bilden Antikörper mit spezifischen Zellbestandteilen Immunkomplexe, die unter einer Farbstoffreaktion sichtbar gemacht werden

können. Unter Verwendung von Antikörpern, die mit spezifischen Tumor-Antigenen reagieren, werden diese Verfahren vor allem auch bei der Entdeckung von Mikrometastasen epithelialer Tumoren wie dem Mamma-Carcinom eingesetzt (Osborne et al. 1989). Von Vorteil ist hierbei, dass epitheliale Antigene in Knochenmark- und Blutzellen normalerweise nicht anzutreffen sind (Cote et al. 1988). In bis zu 45% von Brustkrebs-Patienten, die für eine autologe KMT vorgesehen waren, konnten okkulte Tumorzellen durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden (Diel et al. 1992). In einer neueren Studie wurden in 199 von 552 (36%) Brustkrebs-Patientinnen Zytokeratin-positive Mikrometastasen im Knochenmark entdeckt (Braun et al. 2000). Dabei kam es bei den 199 positiv getesteten in 49 Fällen zu einem Tumor-bedingten Tod nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Jahren. Im Gegensatz zu epithelialen Tumoren reichen einzelne Antikörper zur Unterscheidung neoplastischer von normalen lymphohämatopoetischen Zellen nicht aus, weil Antigene, die maligne Zellen exprimieren auch bei normalen Zellen nachweisbar sind (Janossy et al. 1979). Zusätzlich besteht auch grundsätzlich die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Antikörper-Kreuzreaktivitäten. Unter Anwendung unterschiedlicher Marker-Kombinationen, die ein für maligne lymphoide Zellen charakteristisches phänotypisches Muster erkennen lassen, gelang auch bei malignen Erkrankungen aus dem hämatologischen Formenkreis der Nachweis von minimaler Resterkrankung. Für B-Zell-Lymphome konnten TdT/CD10/CD19/ CD34/ CD34- für T-Zell-Malignome TdT/CD3/CD5 -Antikörper-Coctails erfolgreich angewandt werden (van Dongen et al. 1992, Campana 1994 und 1995). Auch bei ALL-Patienten wurden immunologische Methoden zur Selektion leukämischer Zellen aus dem Knochenmark eingesetzt (Bregni et al. 1989). Die mikroskopische immunhistochemische Analyse erfordert die Untersuchung einer größeren Anzahl von Zytozentrifugations-Präparaten, um eine Sensitivität des Nachweises von einer Tumorzelle in 10000 normalen Knochenmarkzellen zu erreichen (Janossy et al. 1988). Mittels der Durchflußzytometrie kann eine maximale Sensitivität der Entdeckung einer malignen Zelle in 10^6 erzielt werden, wobei die Sensitivität für praktische Anwendungen eher mit einer Zielzelle in 10^4 angegeben wird (Gross et al. 1993, Campana 1994).

Der Nachweis von minimaler Resterkrankung mittels Zellkultur-Technik, wie sie auch

in dieser Studie angewendet wurde, ergab bisher eine Nachweisgrenze maligner Zellen von $1:10^5$ (Joshi et al. 1990). Das Prinzip dieser Methode beruht in der Annahme, dass unter bestimmten Kulturbedingungen Tumorzellen exklusiv oder bevorzugt wachsen und somit minimale maligne Kontaminationen besser nachweisbar sind. Ein Nachteil besteht darin, dass die Einflüsse der Kulturmedien wie Kälberserum, menschliches Plasma oder Phythämoagglutinin in Bezug auf das Zellwachstum wenig definiert sind. Weiterhin muß angenommen werden, dass auch das Knochenmark-Stroma, die extrazelluläre Matrix sowie Integrine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren neoplastische Zellen in ihrem biologischen Verhalten mitkontrollieren (Bradstock et al. 1995). In einigen Studien wurde nur eine geringe Anzahl leukämischer Kolonie-formender Zellen (0,01% bis 1%) beobachtet (Estrov et al. 1988, Uckun et al. 1987), was auf für Tumorzellen mangelhafte Kulturbedingungen schließen läßt. Andererseits könnten falsch-positive Ergebnisse entstehen, wenn das Kultur-Milieu gutartige Zellen zur Transformation veranlaßt. In klinischen Studien finden sich große Unterschiede beim Nachweis von minimaler Resterkrankung mittels in-vitro Kultursystemen. Sharp und Mitarbeiter (1992) fanden in 22 von 59 Fällen okkulte Lymphom-Kontamination des Knochenmarks bei Kandidaten für die autologe KMT. In anderen Studien gelang der Nachweis von minimaler Resterkrankung in 3 von 17 (Uckun et al. 1986) und 32 von 48 Fällen (Ross et al. 1993). In einer Studie mit 83 Patienten fanden Uckun und Mitarbeiter bei 42 Patienten Kolonie-formenden Zellen höheren Ausmaßes, wobei in 38 Fällen ein Rezidiv eintrat. Bei den 41 Patienten mit niedrigeren Werten kam es bei 20 zu einem Rezidiv (Uckun et al. 1993). In den erwähnten Studien wurden ALL-Patienten untersucht, bei denen naturgemäß überwiegend eine KM-Infiltration vorkommt.

Das Vorkommen genetischer Abnormalitäten kann durch verschiedene Analysen für die Entdeckung von minimaler Resterkrankung genutzt werden. Auch konventionelle zytogenetische Techniken, basierend auf chromosomalen Veränderungen, werden für das Monitoring von minimaler Resterkrankung eingesetzt (Hagenmeijer et al. 1986, Freireich et al. 1992). Dabei hängt der Erfolg der Metaphasen-Analyse von der Anzahl der Metaphasen und damit von der Proliferationsaktivität der neoplastischen Zellen ab, die von Fall zu Fall sehr unterschiedlich sein kann. Einen Vorteil bietet hierbei die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), bei der Chromosom- und Gen-spezifische Sonden

zur Identifizierung numerischer und struktureller chromosomaler Aberrationen an sich nicht teilenden, in der Interphase befindlichen Zellen eingesetzt werden. Naturgemäß besteht die Gefahr falsch-positiver Analysen durch das Vorkommen von Aneuploidie nicht maligner Zellen. Neben dem Nachweis aneuploider Zellen werden auch Lokus-spezifische Genproben, z.B. gegen BCR und ABL bei der CML t(9;22), zur Identifizierung maligner Tumor-Kontaminationen benutzt (Tkachuk et al. 1990). Die Sensitivität dieser Assays liegt bei 1%-5% (Gray et al. 1990). In der klinischen Anwendung gelang der Nachweis von minimaler Resterkrankung im Knochenmark durch FISH in 3 von 7 morphologisch in der Remissionsphase stehenden Fällen, von denen zwei ein Rezidiv entwickelten (Nylund et al. 1994).

Durch molekulargenetischen Nachweis klonaler Rekombination der V, D und J-Antigenrezeptor Gen-Segmente können Neoplasien des lymphatischen Systems nachgewiesen werden (Cleary et al. 1984, Korsmeyer 1983, Waldmann 1987). Dabei werden bei Lymphomen der B-Zell-Reihe überwiegend monoklonale Rearrangements der Immunglobulin-Schwerketten-Region (IgH), bei T-Zell-Neoplasien überwiegend T-Zell-Rezeptor-beta-Gen (TZR β) Rearrangements nachgewiesen (Kneba et al. 1986). Entsprechend wurden im konventionellem DNS-Hybridisierungs-Verfahren (Southern Blot) überwiegend IgH- und TZR β -Gensonden verwendet (Katz et al. 1989), wie es auch in dieser Studie durchgeführt wurde.

Die Sensitivitäts-Analysen dieser Studie bestätigten die Ergebnisse anderer Autoren. Dabei konnte eine Nachweisgrenze von 2,5% Lymphomzell-DNS in einer normalen Knochenmark-Zell-Population erreicht werden (Cleary et al. 1984, Zehnbauer et al. 1986). Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass IgH- und TZR-Monoklonalität auch bei nicht malignen Erkrankungen, u.a. beim Sjögren-Syndrom, der Ataxia teleangiectatica sowie gutartigen lymphoiden Erkrankungen in Einzelfällen, auftreten kann (Fishleder et al. 1987, Heppel et al. 1988, Stern et al. 1989). Andererseits gibt es Hinweise für das Vorkommen polyklonaler Lymphome. Vor allem bei Lymphomen, die nach Transplantationen auftreten, Aids-assoziierten NHL sowie „Vorläufer“-ALL können monoklonale Muster in vielen Fällen nicht nachgewiesen werden (Hanto et al. 1983, Kaplan et al. 1995, Griesser et al. 1989, Krause et al. 1996).

Seit der Entdeckung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 1987 durch Mullis und Saiki steht eine weitere außerordentlich sensitive molekularbiologische Methode zum

Nachweis von minimaler Resterkrankung zur Verfügung. Dabei werden spezifische DNS-Sequenzen durch eine hitzestabile DNS-Polymerase amplifiziert. Oligonukleotid-Primer (kurze DNS-Sequenzen mit einer Länge zwischen 18 und 30 Nukleotiden) flankieren hierbei die zu amplifizierende Genregion. Die Reaktion besteht aus einer Serie von Zyklen, bei denen jeweils DNS-Strang-Denaturierung, Primer-Bindung und Primer-Extension aufeinander folgen und so das spezifische DNS-Fragment exponentiell akkumuliert wird, da die amplifizierten DNS-Produkte in jedem neuen Zyklus als neue Vorlage dienen. Andere Strategien der PCR-Methode liegen in der Amplifikation Gewebs- und Tumor-spezifischer messenger RNS (mRNS). Durch das Umschreiben der mRNS in einen komplementären DNS-Strang (cDNS) durch das Enzym reverse Transkriptase können auch lange Sequenzen, bei denen zwischengeschaltete, nicht exprimierende Gensequenzen (Introns) wegfallen oder Gewebs-spezifische RNS-Exprimierungen amplifiziert werden (RT PCR). Anwendung fand die RT PCR auch in der Detektion von minimaler Resterkrankung bei der CML für den Nachweis der t(9,22) Translokation, beim Prostata-Karzinom für die Entdeckung einer PSA mRNS Exprimierung in Blut und Knochenmark ebenso wie der Keratin mRNS Detektion beim Brustkrebs sowie anderer solider Tumoren (Datta et al. 1994, Ghossein et al. 1995, Lange et al. 1989; Krüger et al. 1996). Um monoklonale IgH-Rearrangements zu entdecken, können JH-Konsensus-Oligonukleotide mit verschiedenen JH-Primern kombiniert werden. Die ca. 100 VH-Regionen können dabei in ca.7 Familien mit homologen Gensequenzen gruppiert werden, was dann 7 Antisense-Primer erforderlich macht. Alternativ kann auch ein Konsensus-Primer, der an eine konservierte VH-Region, nämlich CDR III, bindet, verwendet werden (Deane und Norton 1990). Analog können TZR-Gen-Rearrangements mit entsprechenden Primern, vornehmlich der TZR χ und TZR δ Regionen, nachgewiesen werden (D'Auriol et al. 1989, Cave et al. 1994). Nur rearrangierte Ig oder TZR Genloki erlauben die Amplifikation distinkter Fragmente, die anhand ihrer Größe in einem hochauflösenden Gel in der Elektrophorese sichtbar gemacht werden können. In nicht rearrangierter DNS liegen die einzelnen Ig und TZR Genloki zu weit voneinander entfernt für eine erfolgreiche Amplifikation, so dass kein distinktes Signal erzielt werden kann. Eine weitere Technik zur Steigerung der Sensitivität in der Entdeckung von minimaler Resterkrankung besteht darin, die erhaltenen PCR-Fragmente zu klonieren oder direkt zu sequenzieren, um anhand der Basensequenz Patienten-spezifische Oligo-

nukleotid-Proben zu syn-thetisieren. Die PCR wird dann mit einem Konsensus Primer und einem Patienten-spezifischem Oligonukleotid durchgeführt (Brisco et al. 1990, Jonsson et al. 1990, Maeda et al. 1994, Kitchingman 1994; Zwicky et al. 1996, Wu et al. 1997). Die Sensitivität dieser Techniken liegt bei $1:10^3-10^6$ und ist damit anderen Methoden, wenn sie nicht kombiniert werden, eindeutig überlegen. Diese extrem hohe Sensitivität birgt allerdings auch die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse vorwiegend durch Kontaminationen, was akribische Vorschriften zu deren Vermeidung erforderlich macht. Auch nicht-spezifische Kreuz-Hybridisierungen der Primer mit ähnlichen Sequenzen normaler lymphoider Zellen können zu falsch-positiven Signalen führen (Ghossein und Rosai 1995, Langlands et al. 1994). Eine weitere Limitation der PCR liegt in der Tatsache, dass während des Krankheitsverlaufs Ziel-Genloki deletieren oder zusätzliche Rearrangements auftreten können, was als „klonale Evolution“ bezeichnet wird. Dabei finden sich auch biklonale und oligoklonale Rearrangements, u.a. in bis zu 45% bei der Vorläufer-ALL (Beishuizen et al. 1991). Beishuizen und Mitarbeiter fanden diese Phänomene auch in 8 von 30 B-Zell ALL, Baruchel und Mitarbeiter beschrieben 5 von 14 bei B-Zell- und 2 von 12 bei T-Zell-ALL (Beishuizen et al. 1994, Baruchel et al. 1995). Andere Autoren beobachteten auch gehäuft unterschiedliche Muster im Rearrangement, die mit der Krankheitsdauer korrelierten (Steenhagen et al. 1993, Steward et al. 1994). Die Immunglobulingen-V-Regionen neigen auch zu somatischen Mutationen und Subklonen, die Primer oder Hybridisierung-Proben im Bindungsverhalten beeinflussen (Küppers 1997). Diese Veränderungen können bei alleiniger Anwendung von Konsensus-Primern oder Patienten-spezifischer Oligonukleotide zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die Entdeckung von minimaler Resterkrankung bei NHL durch die PCR-Technik wird daher durch das Vorkommen multipel rearrangierter Immunglobulingene und im Verlauf sich ändernder Rearrangements ernsthaft eingeschränkt. Hier liegt ein Vorteil in der in dieser Studie vorgestellten Methode, die Patienten unabhängige Hybridisierungs-Gensonden verwendet, die unabhängig von dem spezifischem Immunglobulin-Rearrangement der Patienten sind. Auch falsch positive Ergebnisse sind wegen der Sensitivitätsgrenze bei der DNS-Filterhybridisierung nahezu ausgeschlossen.

Ein Ziel bei der Entdeckung von minimaler Resterkrankung ist neben der Feststellung

der Präsenz die Quantifizierung der Tumorlast. In dem hier vorgelegtem kombinierten System aus Flüssigkultur und Hybridisierung kann eine Quantifizierung nicht vorgenommen werden. Auch die PCR hat ein limitiertes Potential in der Quantifizierung der nachgewiesenen Tumorzellen, da die Amplifikation der Zielsequenzen nach einer gewissen Zykluszahl ein Plateau erreicht und auch die Hybridisierung der Primer an in geringer Frequenz vorhandenen DNS-Abschnitten in unterschiedlichen Zeiten der PCR geschehen kann. In seriellen Verdünnungsversuchen versuchten verschiedene Autoren die Intensität der PCR-Signale für eine Quantifizierung von minimaler Resterkrankung zu nutzen. Doch die Variabilität und Nichtlinearität der PCR-Ansätze mindern die Genauigkeit dieser Methoden (Cave et al. 1994, Gilliland et al. 1990, Sykes et al. 1992). Brisco und Mitarbeiter zeigten in neueren Studien, dass eine Quantifizierung von minimaler Resterkrankung verbessert werden kann durch zwei-Stufen Verdünnungsexperimente sowie kalkuliertem Vergleich von IgH-Rearrangement-Amplifikaten mit N-RAS PCR-Produkten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines rezidivfreien Langzeit-überlebens bei Patienten mit ALL signifikant korreliert ist mit einem Nachweis von mehr als einer leukämischen Zelle in 1000 Knochenmarkzellen, was ca. einer Tumorlast von mehr als 10^6 Leukämiezellen im Knochenmark entspricht (Brisco et al. 1994). Sehr aufwendig erscheinen die quantifizierenden Analysen von Yamada und Mitarbeitern, die CDR III-Sequenzen in Bakteriophagen klonierten und mittels JH-Konsensus Proben vergleichende Hybridisierungen durchführten (Yamada et al. 1990). Auch die RT PCR zeigt bei der Quantifizierung der malignen Zellen Schwierigkeiten, wegen variabler Degradierung der RNS sowie variabler Effizienz der Konversion von RNS in cDNS (Gilliland et al. 1990). Vielversprechend in der Lösung dieser Probleme erscheint hier die Anwendung der Echtzeit-PCR, die mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes (TaqMan), das in der exponentiellen Phase der PCR Fluoreszenz-Farbstoffe, die an Hybridsonden gekoppelt sind, quantitativ bestimmt und so eine Messung der PCR-Amplifikate erlaubt (Dölken et al. 1998, Olsson et al. 1999). Hierbei liegen allerdings noch keine Langzeit-Erfahrungen hinsichtlich der klinischen Relevanz bei der Entdeckung von minimaler Resterkrankung vor.

Klinische Analysen, die den Nachweis von minimaler Resterkrankung mit der Prognose korrelierten zeigen divergierende Ergebnisse. In vielen Studien, die mittels der PCR mi-

minimale Resterkrankung entdeckten, konnte eine Übereinstimmung mit dem Auftreten eines Rezidivs gezeigt werden (Kitcingman 1994, Biondi et al. 1992, Potter et al. 1993, Cave et al. 1994, van Dongen et al. 1998). In einer großen prospektiven Studie mit 240 Patienten konnten van Dongen und Mitarbeiter in einem sehr aufwendigem semiquantitativem PCR-Verfahren, das patientenspezifische Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgen Rearrangements nachweist, minimale Restkrankheit bei der ALL nachweisen (van Dongen et al. 1998). Negative PCR-Ergebnisse waren mit einer niedrigen Rezidivrate (3-15% nach 3 Jahren), PCR-positive mit einer fünf bis zehnfach höheren Rezidivrate (39-86%) assoziiert. Auffällig hierbei war auch, dass die Knochenmark-Untersuchung zum Zeitpunkt nach der Induktionstherapie noch bei 46% der Patienten in kompletter Remission positiv war. Auch in anderen Arbeiten verblieben Patienten über zwei Jahre in kompletter klinischer Remission trotz Nachweises minimaler maligner Kontamination (Nizet et al. 1993, Yamada et al. 1990, Yokota et al. 1991). Nizet u. Mitarbeiter fanden in 16 Fällen minimale Restkrankheit ohne dass es bei 9 Patienten zu einem Rezidiv kam nach einem Beobachtungszeitraum von mehr als 2 Jahren. Es erscheint, dass einzelne positive PCR-Ergebnisse nicht zuverlässig ein Rezidiv anzeigen, so dass aufwendige Verlaufskontrollen zwingend erforderlich sind, um die Wertigkeit bezüglich eines Rezidives bei positiven Proben festzustellen. Auch existieren Studien, in denen es zu Rezidiven kam, ohne dass positive PCR-Ergebnisse vorlagen. (Ito et al. 1993; Biondi et al. 1992). In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass die häufig verwendeten immunhistochemischen und PCR-Nachweisverfahren ohne vorherige Zellkultivierung die Viabilität und das klonogene Potential der entdeckten Tumorzellen in keiner Weise berücksichtigen. Der bisher wenig verstandenen Biologie eines Rezidivs wird kaum Rechnung getragen. So muss davon ausgegangen werden, dass auch durch Radio- oder Chemotherapie stark geschädigte oder tote Tumorzellen durch die PCR-Technik entdeckt werden, was die z.T. hohe Positivrate bei Patienten, die kein Rezidiv erleiden, erklären würde. Hier sei eine Studie von Roberts und Mitarbeitern erwähnt, die in einem Beobachtungszeitraum bis 35 Monate nach Beendigung der Chemotherapie in 15 von 17 ALL-Patienten trotz klinischer Remission Hinweise für minimale Resterkrankung durch PCR-Analyse fanden (Roberts et al. 1997). Die Sensitivität des Tumornachweises mittels der PCR ist sicherlich hoch, dennoch ist eine Sensitivität über $1:10^6$ bisher nicht sicher erreicht. Ferner kann die klonale Evolution der Tumorzellen, wie bereits

oben erwähnt, das PCR-Nachweisverfahren weiter einschränken, was auch in der Arbeit von van Dongen und Mitarbeitern (van Dongen et al. 1998) teilweise zur zusätzlichen Anwendung der DNS-Filterhybridisierung führte. Insgesamt weisen die unterschiedlichen, teils auch divergierenden Ergebnisse bei der Entdeckung minimaler Restkrankheit mittels der PCR-Technologie auf die Schwierigkeit der Standardisierung dieser Technik hin, die aber notwendig ist, um die Positiv- oder Negativ-Ergebnisse dieses Nachweisverfahrens klinisch einordnen zu können.

Von therapeutisch-klinischer Relevanz ist der Nachweis von minimaler Tumorkontamination in peripheren Stammzell-Kollektionen (PBSC). Hierbei werden aus dem peripheren Blut gewonnene Stammzellen, die über Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF) angereichert werden, dem Patienten nach Chemo- und Bestrahlungstherapie infundiert. Von besonderem Interesse für Tumornachweisverfahren ist dabei die autologe Stammzelltransplantation. Auch hier zeigen Untersuchungen hinsichtlich des Tumornachweises in der Stammzell-Kollektion und des klinischen Verlaufes uneinheitliche Ergebnisse. Kanteti und Mitarbeiter konnten Tumorzell-Kontamination bei Patienten mit NHL in Knochenmark (65%) und PBSC (73%) mittels PCR-Analyse nach Hochdosis-Chemotherapie nachweisen, wobei lediglich ein Trend zur Verbesserung der Überlebenszeit bei PCR-negativen Patienten beobachtet wurde (Kanteti et al. 1999). Mittels immunhistochemischer Analyse entdeckte Tumorzell-Kontamination bei Brustkrebs-Patientinnen, ergab in 23/57 (40%) Fällen einen Tumornachweis in KM oder PBSC vor autologer Transplantation, ohne dass dies Einfluss auf die Prognose hatte (Cooper et al. 1998). In anderen Arbeiten wurden nur in 21/203 (10%) der Patienten mit Brustkrebs (Stadium II-IV) Tumorzellen in KM oder PBSC entdeckt (Franklin et al. 1999). Auch hier zeigt sich in divergierenden Ergebnissen verschiedener Studien die Schwierigkeit in der Einschätzung der prognostischen Relevanz von minimaler Tumor-Kontamination zum einen und zum anderen die z.T. sehr unterschiedliche Häufigkeit entdeckter minimaler Restkrankheit trotz ähnlicher Nachweismethoden und ähnlichem Patienten-Kollektiv.

Wenige prospektive Studien existieren, die wie in dieser Arbeit molekulare Tumornachweisverfahren mit vorausgehender in-vitro-Kultivierung verbinden. Nur die Arbeitsgruppen von Sharp und Estrov untersuchten bisher diese Technik (Sharp et al. 1992 und

1996; Estrov et al. 1994; Wu et al. 1997). Sharp und Mitarbeiter konnten in 11 von 59 Fällen ein Ig-Rearrangement nach in-vitro-Kultivierung der KM-Zellen nachweisen. 5,5% der kultur-positiven Patienten überlebten 3 Jahre (Median der Nachbeobachtungszeit 14 Monate), hingegen 35,7% der kultur-negativen Patienten, was einen signifikanten Unterschied bedeutet ($P < 0.02$). Allerdings blieben 3 von 5 kultur-positiven Patienten in kompletter Remission, obwohl sie nicht transplantiert wurden. Die Sensitivität des Nachweises von Tumorzellen in mononukleären KM-Zellen in dieser Studie betrug $1:10^4$. In einer retrospektiven Studie von Sharp und Mitarbeitern wurden die Aspiate von Knochenmark und Stammzellen, die zur autologen Transplantation dienten, untersucht (Sharp et al. 1996). Die 5-Jahres-Überlebensrate ohne Rezidiv der Aspirat-negativen Patienten betrug 64% (Leukapherese) und 57% (Knochenmark) im Vergleich zu 17% bei Aspirat-positiven Patienten. Wu und Mitarbeiter verwendeten patienten-tumor-spezifische Primer und Gensonden nach in-vitro Kultivierung von Knochenmark(KM)-oder peripheren (PB) Blutzellen bei NHL-Patienten. Tumorkontamination wurde in 100% T-NHL und 44% B-NHL beobachtet. In fünf Proben wurden Tumorzellen erst nach in-vitro Kultivierung entdeckt. Ein Nachteil dieser Studie war, dass in über 50% der B-Zell-NHL die originale IgH CDRIII Sequenz nicht erhältlich war aufgrund mangelhaften Ausgangsmaterials (Zellen aus Paraffinblöcken) sowie inadäquater Amplifizierung durch die Primer. Angaben zum klinischen Verlauf, insbesondere hinsichtlich eines Rezidives lagen nicht vor (Wu et al. 1997).

Neben der Steigerung der Sensitivität liegt ein Vorteil in der hier vorgestellten kombinierten kultur-molekulargenetischen Nachweismethode darin, dass im Kulturverfahren die Vitalität und das klonogene Potential der Zellen Berücksichtigung finden. Ob dies auch das Verhalten der Tumorzellen in-vivo reflektiert oder eine Annäherung an die bisher wenig verstandene Biologie von Infiltration und Metastasierung darstellt, muss zunächst offen bleiben. Desweiteren werden durch die DNS-Filterhybridisierung die Schwierigkeiten bei der Standardisierung des PCR-Verfahrens hinsichtlich des Monoklonalitäts-Nachweises umgangen. Weitere klinische Studien mit größeren Fallzahlen und mehrjähriger Nachbeobachtungszeit werden notwendig sein, den biologischen und prognostischen Wert des hier vorgestellten Tumornachweisverfahrens zu evaluieren.

6. Zusammenfassung

Minimale Resterkrankung bei hämatopoetischen Neoplasien bedeutet eine Tumorzell-Kontamination des Gewebes unterhalb der konventionellen lichtmikroskopischen Nachweisgrenze von 1-5%. Ob die Entdeckung von minimaler Resterkrankung in Knochenmark und peripherem Blut auch zu einer Rezidiv-Erkrankung führt, ist trotz zahlreicher prospektiver Studien bisher nicht eindeutig geklärt. Basierend auf überwiegend immunologischen und molekulargenetischen Testverfahren divergieren die Ergebnisse hinsichtlich des Nachweises von minimaler Restkrankheit, der Prognose und des Verlaufes der Erkrankung.

In dieser Studie wurde ein Assay etabliert, das eine Sensitivität in der Detektion von malignen lymphoiden Zellen in Knochenmark und peripherem Blut durch ein kombiniertes in-vitro Verfahren aus Langzeitflüssigkultur und DNS-Hybridisierungsexperimenten reproduzierbar bis zu einer Tumorzelle in einer Million mononukleären Knochenmarkzellen erreicht. Dabei wurden Knochenmarkzellen gesunder Spender mit Lymphomzellen der B- und T-Zell-Reihe gemischt und nach sechswöchiger Inkubation sowohl morphologisch als auch mittels spezifischer Gensonden hinsichtlich des Vorkommens monoklonaler Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgen-Rearrangements untersucht.

Desweiteren wurde das Verfahren bei der Kultivierung von Knochenmarkzellen an malignen Lymphomen erkrankter Patienten in 25 Fällen eingesetzt. Hierbei zeigten 3 von 20 (15%) der Patienten mit B-Zell-Lymphom und 1 von 5 (20%) der Patienten mit T-Zell-Lymphom Tumorzell-Kontamination in dem Zell-Langzeitkultur/DNS-Hybridisierungs-Assay. In allen 4 Kultur-positiven Fällen entwickelten die Patienten ein Rezidiv innerhalb von 11 Monaten, so dass ein positiver Prädiktiv-Wert von 100% bestand. In 6/21 (29%) der Fälle trat bei den Patienten ein Rezidiv innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von über 6 Jahren auf, ohne dass in dem Kultursystem maligne lymphoide Zellen detektiert werden konnten. Das kumulative Überleben für die Tumor-Assay negativen Patienten ergab nach 60 Monaten 67%.

7. Literaturverzeichnis

Acuto, O., E.L. Reinherz. 1985. The human T-cell receptor.

N. Engl. J. Med. 312: 1100-1111

Alt, F., D. Baltimore. 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments:

Implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4118-4122

Arceci, R.J. 1993. Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies.

Blood 81: 2215-2223

Arnold, A., J. Cossman, A. Bakhshi, E. S. Jaffe, T. A. Waldmann, J. Korsmeyer. 1983. Immunoglobulin-gene rearrangement as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms.

N. Engl. J. Med. 309: 1593-1599.

Bartram, C.R., E. Kleihauer. 1984. Molekulare Mechanismen der Antikörpersynthese.

Monatsschr. Kinderheilkd. 132: 765 - 773.

Beishuizen, A., K. Hählen, A. Hagemeijer, M.A. Verhoeven, H. Hooijkaas, .J. Adriaansen, I.L. Wolvers-Tettero, E.R. van Wering, J.J. van Dongen. 1991.

Multiple rearranged immunoglobulin genes in childhood acute lymphoblastic leukemia of precursor B-cell origin.

Leukemia 5: 395-402.

Beishuizen, A., M.A.J. Verhoeven, E.R. Van Wering, K. Hahlen, H. Hooijkaas, J.J.M. Van Dongen. 1994. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: Implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis.

Blood 83: 2238-2247

Bertness, V., I. Kirsch, G. Hokis, B. Johnson, P.A. Bunn. 1985. T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphoma.

N. Engl. J. Med. 313: 534 - 538.

Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids. Res. 7: 1513-1522.

Blin, N., D. W. Stafford. 1976. Isolation of high molecular weight DNA.

Nucleic Acids Res. 3: 2303 - 2308.

Bothwell, A. L.M., M. Paskind, M. Reth, T. Imanishi - Kari, K. Rajewsky, D. Baltimore. 1981. Heavy chain variable region contribution to the NP (b) family of antibodies: Somatic mutation evident in a2a variable region.

Cell 24: 625-637

Brack, C., M. Hirama, R. Lenhard-Schuller, S. Tonegawa. 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination.

Cell 15: 1-14

Braun, S., K. Pantel, P. Muller, W. Janni, F. Hepp, C.R. Kentenich, S. Gastroph, A. Wischnik, T. Dimpfl, G. Kindermann, G. Riethmuller, G. Schlimok. 2000. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.

N. Engl. J. Med. 342: 525-533

Bregni, M., S. Siena, A. Neri, R. Bassan, T. Barbui, D. Delio, G. Bonadonna, R. Dalla-Favera, M. Gianni. 1989. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia detected by immune selection and gene rearrangement analysis.

J. Clin. Onc. 7: 338-343.

Brisco M.J., L.W.Tan, A.M.Orsborn, A.A. Morley. 1990. Development of a highly sensitive assay, based on the polymerase chain reaction, for rare B-lymphocyte clones in a polyclonal population.

Br. J. Haematol. 75: 163-167

Brisco, M.J., J. Condon, E. Hughes, S-H. Neoh, P-J. Sykes, R. Seshadri, I. Toogood, K. Waters, G. Tauro, H. Ekert, A.A. Morley. 1994. Outcome prediction in childhood lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction.

Lancet 343: 196-200

Campana, D., R.O. Freitas, E. Coustan-Smith. 1994. Detection of residual leukemia with immunologic methods: technical developments and clinical implications.

Leu. Lymphoma 13 Suppl. 131-34

Campana, D., C.H. Pui. 1995. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance.

Blood 85:1416-1434

Cave, H., P. Guidal, P. Rohrlich, M.H. Delfau, A. Broyart, B. Lescour, C. Rahimy, O. Fenneteau, L. D'Auriol J. Elion, E. Vilmer, B. Grandchamp. 1994. Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood lymphoblastic leucemia by polymerase chain reaction study of δ and γ -cell receptor genes.

Blood 83: 1892-1902.

Carbone, P.P., H.S. Kaplan, K. Mushoff. 1971. Report of the Comitee on Hodgkin's Disease Staging Classification.

Cancer Res. 31: 1860-1861.

Carella, A.M., S. Giralt, S. Slavin. 2000. Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stemm cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia.

Haematologica 85: 304-313.

Cleary, M.I., R. Warnke, J. Sklar. 1984. Monoclonality of lymphoproliferative lesions in cardiac transplant recipients.

N. Engl. J. Med. 310: 477-482

Cooper, B.W., T.J. Moss, A.A. Ross, J. Ybanez, H.M. Lazarus. 1998. Occult tumor contamination of hematopoietic stem-cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer.

J. Clin. Oncol. 16:3509-3517

D'Auriol, L., E. Macintyre, F. Galibert, F. Sigaux. 1989. In vitro amplification of T cell gamma gene rearrangement: A new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia 3: 155-158

Davies, D.R., E. A. Padlan, D.M. Segal. 1975. Three-dimensional structure of immunoglobulins.

Ann. Rev. Biochem. 44: 639-667

Davis, M.M., P.J. Bjorkmann. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.

Nature 334: 395 - 402.

Deane M., K.P. McCarthy, L.M. Wiedemann, J.D. Norton. 1991. An improved method for detection of B-lymphoid clonality by polymerase chain reaction.

Leukemia 5: 726-730

Diel, I.J., M. Kaufmann, R. Goerner, S.D. Costa, S. Kaul, G. Bastert. 1992. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis.

J. Clin. Oncol. 10: 1534-1539

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

Biotechniques 6: 1058-1064.

Van Dongen, J.J.M., T.M. Breit, H.J. Adriaansen, a. Beishizen, H.Hooijkaas. 1992. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction.

Leukemia 6: 47-59

Van Dongen, J.J., T. Seriu, E.R. Panzer-Grumayer, A. Biondi, A.J. Pongers-Willems, L. Coral, F. Stolz, M. Schrappe, G. Masera, W.A. Kamps, H. Gadner, E.R. van Wering, W.D. Ludwig, G. Basso, M.A. de Bruijn, G. Cazzaniga, K. Hettinger, A. van der Does-van den Berg, W.C.Hop, H. Riehm, C.R. Bartram. 1998. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood.

Lancet 352: 1731-1738.

Dreyer W.J., J.D. Bennett. 1965. The molecular basis of antibody formation: A paradox.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 864 - 869.

Edelmann, G.M. 1973. Antibody structure and molecular immunology.

Science 180: 830 - 840.

Estrov Z., M.H. Freedman. 1988. Growth requirements for human acute lymphoblastic leukemia cells: Refinement of a clonogenic assay.

Cancer Research 48: 5901-5907

Estrov Z., M.V. Ouspenskaia, E.A. Felix, K.L. McClain, M-S Lee, D. Harris, D.P. Pinkel, T.F. Zipf. 1994. Persistence of self-renewing leukemia cell progenitors during remission in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia 8: 46-52

Falkenburg H.H.F., R. A. Wafelman, P. Joosten, W.M. Smit, C. van Bergen, R. Bongaerts, E. Lurvink, M. van der Hoorn, P. Kluck, J. Landegent, H.C. Kluin-Nelemans, W.E. Fibbe, R. Willemze. 1999. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes.

Blood 94: 1201-1208

Feinberg, A.P., B. Vogelstein. 1983. Techniques for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.

Anal. Biochem. 132: 6-13.

Fishleder, A., R. Tubbs, B. Hesse, H. Levine. 1987. Uniform detection of immunoglobulin - gene rearrangement in benign lymphoepithelial lesions.

N. Engl. J. Med. 316: 1118 - 1121.

Flug, F., P.G. Pelicci, R. Bonetti, D.M. Knowles, R. Dalla-Favera. 1985. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3460 - 3464.

Foon, K.A., Todd, R.F. 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma.

Blood 68: 1-31

Franklin, W.A., J. Glaspy, S.M. Pflaumer, R.B.Jones, L. Hami, C. Martinez, J.R. Murphy, E.J. Shpall. 1999. Incidence of tumor-cell contamination in leukapheresis products of breast cancer patients mobilized with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or with G-CSF alone.

Blood 94: 340-347

Fuchs , Blakesley. 1983. Guide to the use of type II restriction enzymes.

In: Methods in enzymology. 100: S. 3 - 38 .(Hrsg. Wu, R., L. Grossman , K. Moldave. New York, Academic Press).

Gilliland, G. 1990. Competitive PCR for quantification of mRNA in: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Hrsg.) PCR Protocols, Academic, San Diego.

Griesser, H., D. Tkachuk, M.D. Reis, T.W. Mak. 1989. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases.

Blood 73: 1402 - 1415.

Gross H.J., B. Verwer, D. Houck, D. Recktenwald. 1993. Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry.

Cytometry 14: 519-

Harris, N.L., E.S. Jaffe, G. Flandrin, H.K. Muller-Hermelink, J. Vardiman. 2000. Lymphoma classification-from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms.

Annals of Oncology 11 (Suppl.1): 3-10

Hedrick, S. M., E.A. Nielson, J. Kavaler, D.I. Cohen, M. M. Davis. 1984. Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins.

Nature 308: 153 - 155.

Heppel, A., S.V. Butterworth, R.J. Hollis, A.A. Kennaugh, D.W. Beatty, A.M.R. Taylor. 1988. Breackage of the T cell receptor alpha - chain locus in non malignant clones from patients with Ataxia teleangiectasia.

Hum. Genet. 79: 360 - 364.

Hieter, P.A., E.E. Max, J.G. Seidmann, J.V. Maizel, P. Leder. 1980. Cloned human and mouse immunoglobulin constant and J regions conserve homology in functional segments.

Cell 22: 197-207

Hood, L., M. Kronenberg, T. Hunkapiller. 1985. T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family.

Cell 40: 225- 229

Horowitz, M.M., R.P. Gale, P.M. Sondel, J.M. Goldmann, J. Kersey, H. Kolb, A.A. Rimm, O. Ringden, C. Rozman, B. Speck, R.L. Truitt, F. E. Zwaan, M.M. Bortin. 1990. Graft-versus-leukemia-reactions after bone marrow transplantation.

Blood 75: 555

Hozumi, N., Tonegawa, S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 3628-3632

Janossy G., F.J. Bollum, K.F. Bradstock, A. McMichael, N. Rapson, M.F. Greaves. 1979. Terminal transferase positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia.

J. Immunol. 123: 1525-1534

Janossy, G., D. Campana, A. Burnett, E. Coustan-Smith, A. Timms, A.N. Bekassy, I. Hann, M.J. Alcorn, T. Totterman, B. Simonsson, M. Bengtsson, P. Poncelet, J.C. Laurent. 1988. Autologous bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukemia-Preclinical immunologic studies.

Leukemia 2: 485-495

Jonsson, O.G., R.L. Kitchens, F.C. Scott, R.G. Smith. 1990. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin hypervariable region specific oligonucleotide probes.

Blood 76: 2072-2079

Kanteti, R., K. Miller, J. McCann, D. Roitman, J. Morelli, C. Hurley, F. Berkman, D. Schenkein. 1999. Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis.

Bone Marrow Transplant 24: 473-481

Kaplan, L.D., B. Shiramizu, B. Herndier, J. Hahn, T.C. Meeker, V. Ng, P.A. Volberding, M.S. McGrath. 1995. Influence of molecular characteristics on clinical outcome in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: identification of a subgroup with favorable clinical outcome.

Blood 85: 1727-1735

Katz, F., L. Ball, B. Gibbons, J. Chessels. 1989. The use of DNA probes to monitor minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia.

Br. J. Haemat. 73: 173-180.

Kirsch, I.R., C.C. Morton, K. Nakahara, P. Leder. 1982. Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes.

Science 216: 301-303

Kitchingman, G.R. 1994. Residual disease detection in multiple follow-up samples in children with acute lymphoblastic leukemia.

Leukemia 8: 395-401

Kneba, M., G. Krieger, U. Brocke, I. Bolz, M. Krönke. 1986. Rearrangements von Immunglobulin und T - Zell Antigen-Rezeptor-Genen als diagnostische Marker bei lymphatischen Neoplasien.

Onkologie 9: 6-9.

Knowles, D. M., P.G. Pelicci, R. Dalla-Favera. 1987. Immunglobulin and T cell receptor beta chain gene DNA probes in the diagnosis and classification of human lymphoid neoplasia.

Mol. and Cell Probes 1: 15-31.

Knowles, D.M., G. Inghirami, A. Ubriaco, R. Dalla- Favera. 1989. Molecular genetic analysis of three AIDS associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B - cell derivation and the possible role of EBV.

Blood 73: 792-799

Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldmann, J.M., b. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, I. Verdonck, D. Niederwieser, F. van Rhee, J. Mittermueller, T.de Witte, E. Holler, H. Ansari. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.

Blood 86: 2041-2050

Kornberg, A. 1969. Active center of DNA polymerase.

Science 163: 1410-1418

Korsmeyer, S.J., P.A. Hieter; J.V. Ravetch, D.G. Poplack, T.A. Waldmann, P. Leder. 1981. Development hierarchy of immunglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 7096-7100.

Korsmeyer, S.J., A. Arnold, A. Bakhshi, J.V. Ravetch, J. Siebenlist. 1983. Immunglobulin gene rearrangement and cell surface antigen exspression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell origins.

J. Clin. Invest.. 71: 301-313.

Krause, D.M., M.J. Fackler, C.I. Civin, W.S. May. 1996. CD34: structure, biology and clinical utility.

Blood 87: 1-13

Krause, K., M. Vierbuchen. 1996. HIV-associated B-cell Non-Hodgkin-Lymphoma: Clinical, Pathological and Molecular Findings.

Path. Res. Pract. 192: 388

Kronenberg , M., G. Siu, L.E. Hood, N. Shastri. 1986. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T- cell antigen recognition.

Ann. Rev. Immunol. 4: 529 - 593

Krüger, W., C. Krzizanowski, M. Holweg, M. Stockschläder, N. Kröger, R. Jung, K. Mross, W. Jonat, A.R. Zander. 1996. Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 679-686

Krüger, W., M. Stockschläder, H. Hassan, A.R. Zander. 1996.

Purging in bone marrow and stem cell transplantation.

J. Lab. Med.4:210-220

Krüger, W.H., M. Stockschlader, S. Hennings, M. Aschenbrenner, M. Gruber, K. Gutensohn, C. Lolinger, F. Giesecking, W.Jonat, A.R. Zander. 1996. Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture.

Bone Marrow Transplant. 18 Suppl. 1: 18-20

Langlands, K., N.J. Goulden, C.G. Steward, M.N. Potter, J.M. Cornish, D.H. Pamphilon, A. Oakhill. 1994. False-positive residual disease assessment after bone marrow transplant in acute lymphoblastic leucemia.

Blood 84: 1352-1353

Leder, P. 1982 . The genetics of antibody diversity.

Sci. Am. 246: 102-114

Lennert, K.. 1981. Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der Kieler-Klassifikation). Springer. Berlin

Link, H., L. Arseniev, O. Bähre, J. Kadar, H. Dietrich, H. Poliwoda. 1996.

Transplantation of CD34+ blood cells.

Blood 87:4903-4909.

Link, H., H.J. Kolb, W. Ebell, D.K. Hossfeld, A. Zander, D. Niethammer, H.

Wandt, H. Grosse-Wilde, U.W. Schäfer. 1997. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen.

Medizinische Klinik 92: 480-491

Maeda, Y., F. Horiuchi, S. Morita, M. Matsuda, C. Shirakawa, H. Masaki, A.

Koyama, H. Hamazaki, t. Fujimoto, K. Irimajiri, A. Horiuchi. 1994. Detection of minimal residual disease using clonospecific primers for CDRIII in patients with acute B lymphocytic leukemia with or without Philadelphia chromosome: Possibility of clinical application as a tool for improving prognosis.

Exp. Hematol. 22: 881-887

Martens, C.M., F.W. Schultz, A. Hagenbeek. 1987. Nonhomogeneous distribution of leukemia in the bone marrow during minimal residual disease.

Blood 70: 1073-1078.

Marcu, K.B. , R.B. Lang, L.W. Stanton, L.J. Harris. 1982. A model for the molecular requirements of immunoglobulin heavy chain class switching.

Nature 298: 87-89

Marcu, K.B. 1982. Immunoglobulin heavy-chain constant- region genes.

Cell 19: 719-721.

Max, E.E., J.G. Seidmann, H. Miller, P. Leder. 1980. Variation in the crossover point of kappa immunoglobulin gene V-J recombination: Evidence from a cryptic gene.

Cell 21: 793-799

McBride, O.W., P.A. Hieter, G.F. Hollis, D. Swan, M.C. Otey, P. Leder. 1982. Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes.

J. Exp. Med. 155: 1480-1490

Minden, M.D., T.W. Mak. 1986. The structure of the T - cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells.

Blood 86: 327-336

Mullis , K.B. , F.A. Faloon. 1987 . Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods Enzymol 155: 335 - 350.

Nizet, Y., S. Van Daele, P. Lewalle, J.L. Vaerman, M. Philippe, C. Vermynen, G. Cornu, A. Ferrant, J.L. Michaux, P. Martiat. 1993. Long-term follow-up of residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients in complete remission using clonogenic IgH probes and the polymerase chain reaction.

Blood 82: 1618-1625

Olsson, K, C.J. Gerard, J. Zehnder, C. Jones, R. Ramanathan, C. Reading, E.G. Hanania. 1999. Real-time t(11;14) and t(14;18) PCR assays provide sensitive and quantitative assessments of minimal residual disease (MRD).

Leukemia 13: 1833-1842.

O'Reilly, R.J.. 1983. Allogeneic bone marrow transplantation: current status and future directions.

Blood 62: 941-964.

Osborne, Michael P., S. Asina, G.Y. Wong, L.J. Old, R. J. Cote. 1989. Immunofluorescent monoclonal antibody detection of breast cancer in bone marrow: sensitivity in a model system.

Cancer Res. 49: 2510-2513.

Philip, I., T. Philip, M. Favrot, M. Vuillaume, B. Fontaniere, D. Chamard, G.M. Lenoir. 1984. Establishment of lymphomatous cell lines from bone marrow samples from patients with Burkitt's lymphoma.

J. Natl. Cancer Inst. 73: 835-840

Philip, T., J.O. Armitage, G. Spitzer, F. Chauvin, S. Jagannath, J.Y. Cahn, P. Colombat, A.H. Goldstone, N.C. Gorin, M. Flesh. 1987. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma.

N. Engl. J. Med. 316: 1493-1498.

Pratt, W.B., R.W. Ruddon, W.D. Ensminger, J. Maybaum. 1994. Determinants of drug responsiveness, in: The Anticancer Drugs. Oxford University, New York, NY; S. 26ff.

Ravetch, J.V., U. Siebenlist, S. Korsmeyer, T. Waldmann, P. Leder. 1981. Structure of the human immunoglobulin μ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes.

Cell 27: 583-591.

Roberts, R.J. 1983. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences.

Nucleic Acids Res. 11: 135-167

Roberts, W.M., Z. Estrov, M.V. Ouspenskaia, D.A. Johstn, K.L. McClain, T.F. Zipf. 1997. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia.

N. Engl. J. Med. 336: 317-323

Roitt, I.M., J. Brostoff, D.K. Male. 1987. Kurzes Lehrbuch der Immunologie .
Georg Thieme Verlag.Stuttgart - New York .

Royer, H.D., E.L. Reinherz. 1987. T lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders.
N. Engl. J. Med. 317: 1136 - 1142.

Sakano, H. , J.H. Rogers, K. Huppi, C. Brack, A. Traumecker, R. Maki, R. Wall, S. Tonegawa. 1979. Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments.
Nature 277: 627 - 633.

Sakano, H., R. Maki, Y. Kurosawa, W. Roeder, S. Tonegawa. 1980. Two types of recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy chain genes.
Nature 286: 676 - 683.

Saiki, R.K. , D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase.
Science 239: 487 - 491.

Saito, H., D.M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen, S. Tonegawa. 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T - cell receptor deduced from cDNA sequences.
Nature 309: 759-762

Schäfer, H.E. 1989. Hämatopoetisches System. In: Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Aufl. S.490ff.

Schmitz, N., P. Dreger, M. Suttorp, E.B. Rohwedder, T. Haferlach, H. Löffler, A. Hunter, N.H. Russel. 1995. Primary transplantation of allogenic peripheral blood progenitor cells mobilised by filgrastim (granulocyte colony stimulating factor).

Blood 85: 1666-1672

Seidman, J.G., P. Leder. 1978. The arrangement and rearrangement of antibody genes.

Nature 276:790-795

Sharp, J.G., S.S. Joshi, J.O. Armitage, P. Biermann, P.F. Coccia, D.S. Harrington, A. Kessinger, D.A. Crouse, S.L. Mann, D.D. Weisenburger. 1992. Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique.

Blood. 79: 1074-1080.

Sharp, J.G., A. Kessinger, D.A. Crouse, J.O. Armitage, P. Biermann, D.D. Weisenburger. 1996. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based in the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvests.

J Clin Oncol. 14: 214-2149

Siena, S., M. Bregni, B. Brando, N. Belli, F. Ravagnani, L. Gandola, A.C. Stern, P.M. Landsdorp, G. Bonadonna, A.M. Gianni. 1991. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients.

Blood 77: 400-409

Siu, G., S.P. Clark, Y. Yoshikai, M. Malissen, Y. Yanagi, E. Strauss, T.W. Mak, L. Hood. 1984: The human T-cell receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that arrange to generate a complete V gene.

Cell 37: 393 - 401.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Steenhagen E.J., O.J.H.M. Verhagen, E.F. van Leeuwen, A.E. von dem Borne, C.E. van der Schoot. 1993. Distinct ongoing Ig heavy chain rearrangement processes in childhood B-precursor acute lymphoblastic leucemia.

Blood 83: 581-589.

Stern, M.-H., I. Theodorou, A. Auria, M.M. Redelsperger, M. Debre, P. Debre, C. Griscelli. 1989. T-cell nonmalignant clonal proliferation in Ataxia teleangiectasia: A cytological, immunological and molecular characterization.

Blood 73: 1285-1290.

Steward, C.G., N.J. Goulden, F. Katz, D. Baines, P.G. Martin, K. Langlands, M.N. Potter, J.M. Chessels, A. Oakhill. 1994. A polymerase chain reaction study of the stability of the Ig heavy chain and T-cell receptor δ gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage lymphoblastic leukemia.

Blood 83: 1355-1362

Sutcliffe, J.G.. 1978. pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotides pairs long.

Nucl. Acids Res 5: 2721-2728

Sykes P.J., S.H. Neoh, M.J. Brisco, E. Hughes, J. Condon, A.A. Morley. 1992. Quantitation of targets for PCR by using limiting dilution.

Biotechniques 13: 444-449

Tonegawa, S., C. Brack., N. Hozumi, V. Pirotta. 1978. Organisation of immunoglobulin genes.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 921-931.

Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity.

Nature 302: 573 - 581.

Uckun, F.M., K. Gajl-Peczalska, J.H. Kersey, L-L-Houston, D.A. Vallera. 1986.

Use of a novel assay to evaluate the cytotoxicity of an immunotoxin containing poke-weed antiviral protein against blast progenitor cells freshly obtained from patients with common B-lineage acute lymphoblastic leukemia.

J. Exp. Med. 163: 347-368

Uckun F.M., J.H. Kersey, K. Gajl-Peczalska, N.A. Heerema, A.J. Provisor, D.

Haag, G. Gichrist, C.W. Song, D.C. Arthur, J. Roloff, B. Lambkin, M. Greenwood, G. Dewald, D.A. Vallera. 1987. Heterogeneity of cultured leucemic lymphoid progenitor cells from B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. 1987.

J. Clin. Invest. 80: 639-646

Uckun F.M., J.H. Kersey, R.Haake, D. Weisdorf, M.E. Nesbit, N.K.C. Ramsay.

1993. Pretrans-plantation burden of leucemic progenitor cells as a predictor of relapse after bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia.

N. Engl. J. Med. 329: 1296-1301

Vaughan, W.P., D.D. Weisenburger, W. Sanger, R.P. Gale, J.O. Armitage. 1987.

Early leucemic recurrence of non-Hodgkin lymphoma after high-dose anti-neoplastic therapy with autologous marrow rescue.

Bone Marrow Transplant. 1: 373-378

Vogelsang, G.B., A.D. Hess. 1994. Graft-versus-host-disease: new directions for a persistent problem.

Blood 84: 2061-2067.

Waldmann, T. A. 1987. Immunglobulin and T- cell receptor genes and lymphocyte differentiation. In: The molecular basis of blood diseases, Hrsg. G. Stamatoyannopoulos, A.W. Nienhuis, P. Leder , P.W. Majerus; Seite 245-270.

Wright, J.J., D.G. Poplack, A .Bakhshi, G. Reaman, D. Cole, J.P. Jensen, S.J. Korsmeyer. 1987. Gene rearrangements as markers of clonal variation and minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Onc. 5: 735-741.

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

Yamada, M., S. Hudson, O. Tournay, S. Bittenbender, S.S. Shane, B. Lange, Y. Tsujimoto, A.J. Caton, G. Rovera. 1989. Detection of minimal residual disease in hemapoietic malignancies of the B-cell lineage by using third complementary-determining region (CDR III) specific probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5123-5127.

Yamada, M., R. Wassermann, B.Lange, B.A. Reichard, R.B. Womer, G. Rovera. 1990. Minimal residual disease in childhood B-lineage lymphoblastic leukemia. N. Engl. J. Med. 323: 448-455

Yanagi, Y., Y. Yoshikai, K. Leggett, C.P. Clark, I. Aleksander, T.W. Mak. 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunglobulin chains. Nature 308: 145-149

Zander, A.R., J. Lyding, S. Bielack. 1991. Transplantation with blood stem cells. Blood Cells 17: 301-309.

Zehnbauer, B.A., D. M. Pardoll, P.J Burke, M.L. Graham, B. Vogelstein. 1986. Immunoglobulin gene rearrangements in remission bone marrow specimens from patients with acute lymphoblastic leukemia.

Blood 67: 835 - 838.

Zwicky, C.S., A. S.B. Maddocks, N. Anderson, J.G. Gribben. 1996. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation.

Blood 88: 3314-3322

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Zander danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für sein anhaltendes Interesse am Fortgang und Abschluss der Arbeit.

Herrn Dr. W. Krüger gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine hervorragende, ausdauernde Unterstützung.

Herrn D. Hennig danke ich sehr für die grafische Verarbeitung des Bildmaterials.

Frau Magdalena Pawilczus danke herzlichst für die Unterstützung und Durchsicht des Manuscriptes.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Knochenmarktransplantation der Universität Hamburg für die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Am 12. Dezember 1965 wurde ich, Korff Krause, in Hamburg geboren. Meine Eltern sind Dr. Karl Krause (Arzt), verstorben 1979, und Ehefrau Ingrid, geb. Paulsmeier, Arzthelferin.

Von 1972 bis 1976 besuchte ich die Grundschule Lutterothstraße, Hamburg, und wechselte 1976 auf die Wichern-Schule sowie 1984 auf die Gesamtschule Horn in Hamburg, an der ich die Hochschulreife 1985 erwarb.

Von 1985 bis 1987 leistete ich den Wehrersatzdienst im Marienkrankenhaus, Hamburg, in der Krankenpflege ab.

Im Oktober 1987 nahm ich an der Universität Hamburg das Studium der Medizin auf und bestand dort im Mai 1994 die ärztliche Prüfung. Meine Arbeiten in der Abt. für Knochenmarktransplantation der Universität Hamburg zu dieser Dissertation begannen während des Studiums. Meine Approbation erfolgte im Dezember 1995.

Von Juni 1994 bis März 1997 arbeitete ich in der Abteilung für Pathologie des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Leiter Prof. Dr. Vierbuchen). Hierbei beschäftigte ich mich auch mit der molekularen Analyse und Diagnostik von Lymphomerkrankungen.

Seit April 1997 bin ich in der Abteilung für Kardiologie des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Leiter: Prof. Dr. Kuck) tätig. Dabei verbrachte ich einen kurzen Forschungsaufenthalt in den Holland Laboratories, Rockville, U.S.A. (Leiter: Prof. Dr. Haudenschild) mit dem Schwerpunkt-Thema Angiogenese. Von Februar 1998 bis März 1999 arbeitete ich in der Inneren Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Wandsbek, Hamburg.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.