

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln Institut für Allgemeine
Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

**Vergleich von zwei Primersets in der
Klonalitätsanalyse im Rahmen der
Lymphomdiagnostik am Institut für Pathologie
der Universitätsklinik Köln**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Malte Mensching
aus Göttingen

promoviert am 11. November 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. S. C. Schäfer

2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. O. R. Dirsch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Frau Dr. rer. nat. Jana Fassunke

Herr Privatdozent Dr. med. S. C. Schäfer

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz wurde nach mit Frau Dr. Fassunke und Herrn PD Dr. Schäfer erarbeiteten Kriterien durch mich aus dem Archivprogramm des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln zusammengestellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden molekularpathologischen Analysen sind von Frau Theresa Buhl (biologisch-technische Assistentin, Institut für Pathologie der Uniklinik Köln) durchgeführt und im Anschluss durch mich interpretiert und ausgewertet worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den

Unterschrift:

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Stephan Schäfer, der mich stets motivierte und dessen Vorschläge, Korrektur und hilfreiche Kritik unverzichtbar für mich waren.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Jana Fassunke, welche mir stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in allen Phasen der Arbeit unterstützte.

Weiterhin gilt mein Dank dem ärztlichen Leiter des Instituts für Pathologie der Uniklinik Köln, Herrn Professor Dr. Reinhard Büttner, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotionsarbeit.

Mein Dank geht insbesondere auch an das Laborteam der Abteilung für molekularpathologische Diagnostik unter der Leitung von Frau Theresa Buhl, ohne deren tatkräftige Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an meinen Vater Martin und seine Frau Gundula sowie auch an meine Mutter Sabine, welche mich auf meinem Weg vom Krankenpfleger zum Arzt von Anfang an vorbehaltlos sowohl mit Ermutigung und einem offenen Ohr als auch finanziell mehr unterstützt haben, als mein Dank jemals ausdrücken könnte.

Abschließend danke ich meiner wundervollen Ehefrau, Délie, welche stets für mich da war, mir in Phasen des Zweifels die nötige Kraft gab und mich immer unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 Lymphome	9
2.2 Epidemiologie der Non-Hodgkin Lymphome	9
2.3 Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome	11
2.4 Diagnostik der Non-Hodgkin Lymphome	12
2.5 Entstehung lymphozytärer Antikörpervielfalt	13
2.6 Molekularbiologische Diagnostik von Lymphomen	19
2.7 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.8 Ziel dieser Arbeit	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Geräte	26
3.2 Reagenzien	27
3.3 Untersuchungsmaterial	28
3.4 Methoden	29
3.4.1. DNA-Isolierung	29
3.4.2. Produktnachweis und Qualitätsbestimmung von extrahierter DNA	30
3.4.3. PCR	32
3.4.3.1. B-Zell – Klonalität: Biomed IGH – PCR	32
3.4.3.2. B-Zell Klonalität: Biomed IGK – PCR	33
3.4.3.3. B-Zell – Klonalität: Standardprimer	34
3.4.3.4. T-Zell Klonalität: Biomed TCRG – PCR	35

3.4.3.5.	T-Zell Klonalität: Biomed TCRB – PCR	35
3.4.3.6.	T-Zell Klonalität: Standardprimer	37
3.4.3.7.	Ablauf der Biomed – PCR	37
3.4.3.8.	Cyclerbedingungen	39
3.4.3.9.	Modifikation der Biomed – PCR	41
3.4.4.	Klonalitätsanalyse mittels Kapillarelektrophorese	42
4.	ERGEBNISSE	43
4.1	Ergebnisse der B-Zell – Klonalitätsanalysen	44
4.1.1.	Follikuläre Lymphome	45
4.1.2.	Diffus großzellige Lymphome	52
4.2	T-Zell – Lymphome	57
5.	DISKUSSION	63
6.	LITERATURVERZEICHNIS	76
7.	ANHANG	82
7.1.	Abbildungsverzeichnis	82
7.2.	Tabellenverzeichnis	83

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deutsch Desoxyribonukleinsäure)
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma (Deutsch diffus großzelliges B-Zell Lymphom)
HE	Hämatoxylin-Eosin
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded Tissue (Deutsch Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe)
FL	Follikuläres Lymphom
FR	Framework Region (Deutsch Gerüstregion)
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
IG	Immunglobulin
IGH	Immunoglobuline heavy chain (Deutsch Schwere Kette des Immunglobulins)
IGL / IG λ	Immunglobulin Lambda = Bestandteil einer leichten Kette des Immunglobulins
IGK / IG κ	Immunglobulin Kappa = Bestandteil einer leichten Kette des Immunglobulins
MCL	Mantle cell lymphoma (Deutsch Mantelzelllymphom)
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Deutsch Boten-Ribonukleinsäure)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
n.n.	Nicht nachweisbar
Nt	Nukleotide
PCR	Polymerase chain reaction (Deutsch Polymerase-Kettenreaktion)
RAG	Recombination-activating gene
RFU	Relative fluorescence units = (Deutsch) Relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonucleic Acid (Deutsch Ribonukleinsäure)
RSS	Recombination Signal Sequence

TCR	T-Zell-Rezeptor
V-D-J Rekombination	Rekombination der Variable, Diversity und Joining Gensegmente im Rahmen der Lymphozytenreifung
WHO	World Health Organisation (Deutsch Weltgesundheitsorganisation)

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eingelagertes genomisches Material aus Zellpopulationen von Patienten mit Lymphomen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Kapillarelektrophorese im Hinblick auf klonale Veränderungen untersucht. Ziel der Arbeit war es, die bisher eingesetzten Standardprimer, welche auf PCR – Primern nach Diss et al. und Lorenzen et al.^{1,2} basierten, mit den von van Dongen et al. entwickelten Biomed-2 – Primern³ zu vergleichen. Diese versprechen zwar eine verbesserte Detektionsrate klonaler Veränderungen von Populationen von Lymphomzellen, jedoch sind sie deutlich teurer und bislang an der Uniklinik Köln nicht erprobt. Durch den Direktvergleich vorselektierter Fälle sollte geprüft werden, ob sich die Detektionsraten klonaler Veränderungen in lymphatischen Zellpopulationen durch den Einsatz der Biomed-2-Methode verbessern lassen. Hierfür wurde zunächst die Biomed-2-PCR etabliert. Folgend wurde aus den Beständen des Instituts in FFPE-Gewebe gebettetes Zellmaterial von Lymphomfällen rekrutiert. Es wurde keine erneute Probengewinnung durchgeführt. Die Fälle wurden der Biomed-PCR und anschließend der Kapillarelektrophorese zur Klonalitätsprüfung zugeführt. Die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse aus den verschiedenen Primersets wurden anschließend miteinander verglichen.

Insgesamt wurden 28 Fälle von folliculären Lymphomen (FL), 15 Fälle von diffus-großzelligen Lymphomen (DLBCL) und 12 Fälle von T-Zell – Erkrankungen untersucht.

Es konnte eine deutliche Überlegenheit der Biomed-2-Primer gegenüber den zuvor verwendeten Standardprimern des Instituts für Pathologie gezeigt werden. So erreichte die Klonalitätsanalyse nach PCR mittels Standardprimer in der Gruppe der folliculären Lymphome im direkten Vergleich mit Biomed-2 lediglich eine Sensitivität von 62%. Bei den DLBCL konnte eine Sensitivität von 46% und bei den T-Zellen sogar nur von 22% erreicht werden.

Die Biomed-2-PCR konnte am Institut für Pathologie etabliert werden. Sie wird nachfolgend aufgrund der überlegenen Detektionsrate trotz höherer Kosten im Sinne des Patientenwohls als Methode der Wahl eingesetzt.

2. Einleitung

2.1 Lymphome

Lymphome sind eine heterogene Gruppe von Krebserkrankungen des lymphatischen Systems, welches zum körpereigenen Immunsystem gehört. Sie zeichnen sich durch die unkontrollierte Proliferation von Zellen der immunologisch bedeutsamen Lymphozyten aus. Je nach Ursprungszelle und morphologischem Erscheinungsbild werden die Lymphome vorrangig in zwei große Gruppen eingeteilt. Zum einen in die Gruppe der, nach ihrem Erstbeschreiber benannten, Hodgkin-Lymphome, zum anderen in die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)^{4,5}.

Die Gruppe der Hodgkin-Lymphome fällt vor allem durch ihre charakteristischen Zellmorphologien auf. In ihren Tumorinfiltraten finden sich typischerweise lichtmikroskopisch erkennbare einkernige Hodgkin-Zellen und die mehrkernigen, an Immunoblasten erinnernden Sternberg-Reed-Zellen. Bei den Hodgkin-Zellen handelt es sich um maligne entartete B-Zellen. Sternberg-Reed-Zellen sind durch Verschmelzung mehrerer Hodgkin-Zellen entstandene mehrkernige Riesenzellen.^{4,6-8}

Diese Arbeit befasst sich mit den Non-Hodgkin-Lymphomen, die daher im Folgenden näher beschrieben werden.

Die Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome gestaltet sich nach weniger eingängigen Kriterien. Zu ihnen zählen alle Lymphome, welche histologisch keine Hodgkin-Lymphome sind. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählt mittlerweile über 70 Unterformen der NHL.^{9,10}

2.2 Epidemiologie der Non-Hodgkin Lymphome

Die NHL bilden im Hinblick auf die Gesamtzahl der Krebserkrankungen eine vergleichsweise kleine Gruppe. So wurden beispielsweise im Jahr 2014 in Deutschland von 226.960 neu diagnostizierten Krebserkrankungen unter Frauen 7.880 in die Gruppe der NHL eingestuft, was einem Prozentanteil von 3,5% entspricht. Bei den Männern stellten sie 9.160 Fälle bei insgesamt 249.160 diagnostizierten Krebsneuerkrankungen (3,7%)⁹.

Abbildung 1 zeigt exemplarisch die prozentualen Anteile der Tumorlokalisationen unter den Krebsneuerkrankungen des Jahres 2014.

**Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014
(ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)**

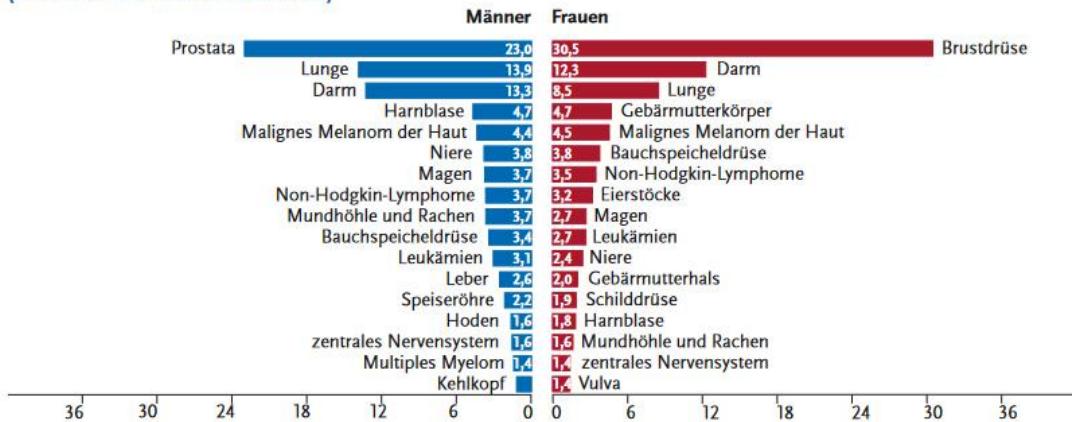


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014. Herausgegeben durch GEKID e.V. (Krebs in Deutschland für 2013/2014, S. 16)

Dennoch gehören die NHL insgesamt zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen weltweit und sind die am meisten auftretenden Krebserkrankungen des hämatologischen Systems^{9,10}. In den 1990er Jahren wurde eine stark ansteigende Inzidenz festgestellt, die sich inzwischen aber auf dem aktuellen Niveau stabilisiert hat^{11–13}. Auffällig ist die im Vergleich zu den Entwicklungsländern deutlich höhere Rate an Lymphomerkrankungen in Industrienationen⁵.

In Abbildung 2 ist die Inzidenz der Lymphomneuerkrankungen und ihre Mortalität in verschiedenen Regionen im Jahr 2014 dargestellt.

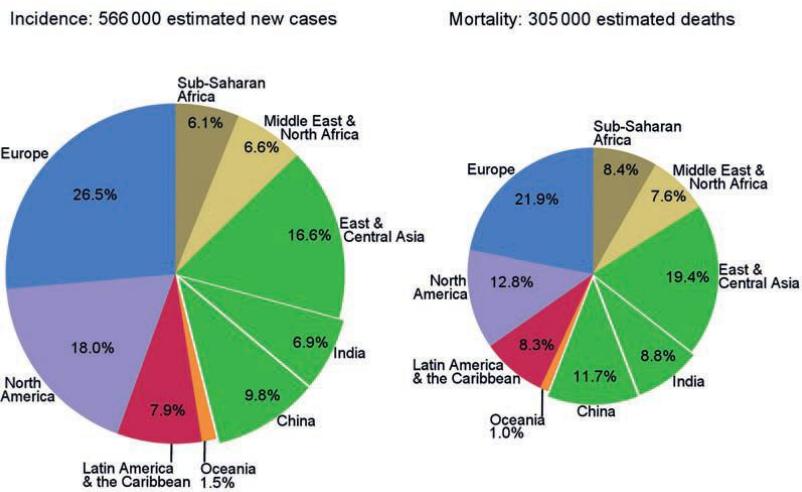


Abbildung 2: Verteilung der geschätzten Neuerkrankungsrate und Mortalität für Lymphomerkrankungen; nach Steward et al., 2014

2.3 Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome

Ein Non-Hodgkin Lymphom entspringt häufig den reiferen Zellstadien der lymphatischen Entwicklung. In Abhängigkeit von Ausdifferenzierungsgrad und Schädigung von Zellerbgut und Zellsignalwegen, entstehen Lymphome mit unterschiedlichen molekularen und klinischen Merkmalen, die in der Klassifikation berücksichtigt werden^{10,13}. Diesem Umstand ist es auch geschuldet, dass die Klassifizierung der NHL komplex ist und sich die Diagnostik einzelner Entitäten oft als herausfordernd erweist. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass die Klassifikation der Lymphome seit ihrer ersten Beschreibung durch Thomas Hodgkin im Jahr 1832 mehrfach überarbeitet, ausgeweitet und weiterentwickelt wurde^{4,14,15}. Nach der aktuellen Klassifikation der WHO werden NHL nicht nur nach histomorphologischen, immunologischen und zytogenetischen, sondern auch nach molekulargenetischen Kriterien in einzelne Entitäten und Untergruppen eingeteilt¹⁶. Je nach ihrer Zellherkunft wird zudem zwischen Lymphomen der B-Zellen und Lymphomen der T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) unterschieden. Entsprechend ihres klinischen Verlaufs können die NHL weiterhin in aggressive und indolente Lymphome eingeteilt werden. Aggressive Lymphome zeichnen sich durch ein schnelles, infiltrierendes Wachstum aus, sprechen jedoch oftmals gut auf zytostatische Therapien an. Die indolenten Lymphome hingegen wachsen meist eher langsam und schlechend, durch ihr oftmals begrenztes Therapieansprechen sind sie aber häufig inkurabel¹⁰.

Der Großteil der NHL ist mit 85-90% aller NHL auf die B-Zellen zurückzuführen. Die restlichen 10-15% teilen sich auf die Lymphome der T-Zellen und der NK-Zellen auf. Die beiden häufigsten Subgruppen, die diffus-großzelligen B-Zell Lymphome (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), welche zu den aggressiven Lymphomen gehören und die indolenten follikulären Lymphome (FL) machen insgesamt etwa 65% aller Non-Hodgkin Erkrankungen aus und sind somit von besonderer Relevanz^{10,13}.

2.4 Diagnostik der Non-Hodgkin Lymphome

Die Diagnose eines Non-Hodgkin Lymphoms wird in der Regel in Zusammenschau aus klinischem Befund, radiologischer Bildgebung, laborchemischer Untersuchung und molekularpathologischem Befund gestellt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der molekularpathologischen Diagnostik, welche daher im Folgenden näher erläutert wird.

Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines Lymphoms ist im Rahmen der erweiterten molekularpathologischen Diagnostik meist eine Biopsie indiziert. Vorzugsweise werden suspekte Lymphknoten im Ganzen exzidiert. Es kann jedoch auch in Fällen, in denen der Lymphknoten schwer erreichbar, oder eine vollständige Exzision aus anderen Gründen nicht praktikabel ist, eine chirurgische Probebiopsie, eine Punktions- oder eine Feinnadelpunktion erfolgen. Vor allem letztere bieten allerdings häufig nicht genügend Material zur sicheren Analyse¹⁰. Das Biopsiematerial wird zunächst vom Pathologen im Rahmen der zytomorphologischen Untersuchung mikroskopisch beurteilt. Meist schließen sich immunphänotypische Methoden an, welche durch den Einsatz spezifischer, markierter Antikörper in der Lage sind, die Ausprägung bestimmter Oberflächenproteine auf den untersuchten Zellen lichtmikroskopisch darzustellen. Viele Lymphome zeigen bereits lichtmikroskopisch gut erkennbare zytomorphologische Veränderungen und ein charakteristisches Proteinexpressionsmuster nach immunhistologischer Reaktion auf ihrer Zelloberfläche. Somit reichen diese Methoden oftmals bereits aus, um die Diagnose zu bestätigen³. Die zytomorphologische Begutachtung allein kann jedoch nicht immer eindeutig zwischen reaktiver Lymphozytenproliferation und kanzeröser Veränderung unterscheiden. Sollten die Oberflächenproteine der Lymphozyten mutationsgebunden zu stark verändert sein, so können die zur Diagnostik erforderlichen Antikörper nicht mehr an sie binden. Dadurch kann die immunhistochemische Reaktion nicht mehr stattfinden. In solchen Fällen stoßen die bewährten Methoden an ihre Grenzen.

Aus diesem Grund haben auch molekularbiologische Verfahren vor allem bei uneindeutigen zytomorphologischen und immunphänotypischen Untersuchungen zunehmend an Bedeutung gewonnen und sind zu einem festen Bestandteil der molekularpathologischen Diagnostik der Lymphome geworden. Diese Verfahren sind in der Lage, das Erbgut der Zellen zu analysieren und sind somit nicht von ihren oberflächlichen Merkmalen abhängig^{17,18}.

Molekularbiologische Verfahren dienen als Grundlage dieser Arbeit, weswegen ihre Prinzipien nun näher erläutert werden.

2.5 Entstehung lymphozytärer Antikörpervielfalt

Um die molekularbiologischen Verfahren in der Diagnostik der NHL verstehen zu können, ist es notwendig, sich zunächst mit dem Heranreifen der Lymphozyten und der Entstehung ihrer Antikörpervielfalt zu beschäftigen. Auf ihrer Oberfläche besitzen die Lymphozyten Rezeptoren, welche unter anderem dazu dienen, Antigene und Antikörper, aber auch körpereigene Zellen zu erkennen und auf diese zu reagieren. Auf der Oberfläche der B-Lymphozyten finden sich membrangebundene Immunglobuline (IG), auf den T-Lymphozyten sind die T-Zell-Rezeptoren (TCR) vertreten. Diese Membranproteine sind antigenspezifisch. Sie sind fähig, ein ganz bestimmtes Antigen, wie beispielsweise einen spezifischen Krankheitserreger, zu erkennen und an diesen zu binden. Die Bindung eines TCR oder IG an sein Zielantigen führt über eine Signalkaskade zur Aktivierung und Proliferation des Lymphozyten¹⁹⁻²².

Die membrangebundenen IG der B-Zellen bestehen aus 4 Untereinheiten, zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten, welche durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden^{23,24}. Die leichten Ketten werden in zwei Unterformen unterteilt, namentlich IGκ bzw. IGκ und IGλ bzw. IGL. Die Leichtketten eines B-Lymphozyten bestehen grundsätzlich entweder aus IGκ oder aus IGλ²³.

Der TCR besteht aus zwei Ketten, meist TCR-α und TCR-β, welche ebenfalls durch eine Disulfidbrücke miteinander in Verbindung stehen^{25,26}. Einige T-Lymphozyten können alternativ auch TCR exprimieren, welche die Ketten TCR-γ und TCR-δ tragen. Die TCR-α und TCR-β machen jedoch mit 85-98% den Hauptanteil unter den T-Zellen aus. Besitzt eine T-Zelle die Ketten α und β, spricht man auch von TCRαβ - Lymphozyten. Im Gegensatz zu diesen stehen die TCRγδ - Lymphozyten²⁷⁻²⁹.

Sowohl die IG, als auch die TCR bestehen aus konstanten (C) Regionen und variablen (V) Regionen. Die variablen Regionen sind an der Erkennung der Antigene entscheidend beteiligt, denn hier befinden sich die Antigenbindungsstellen²³.

Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau eines membrangebundenen Immunglobulins auf einem B-Lymphozyten, in Abbildung 4 ist die schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptors zu sehen.

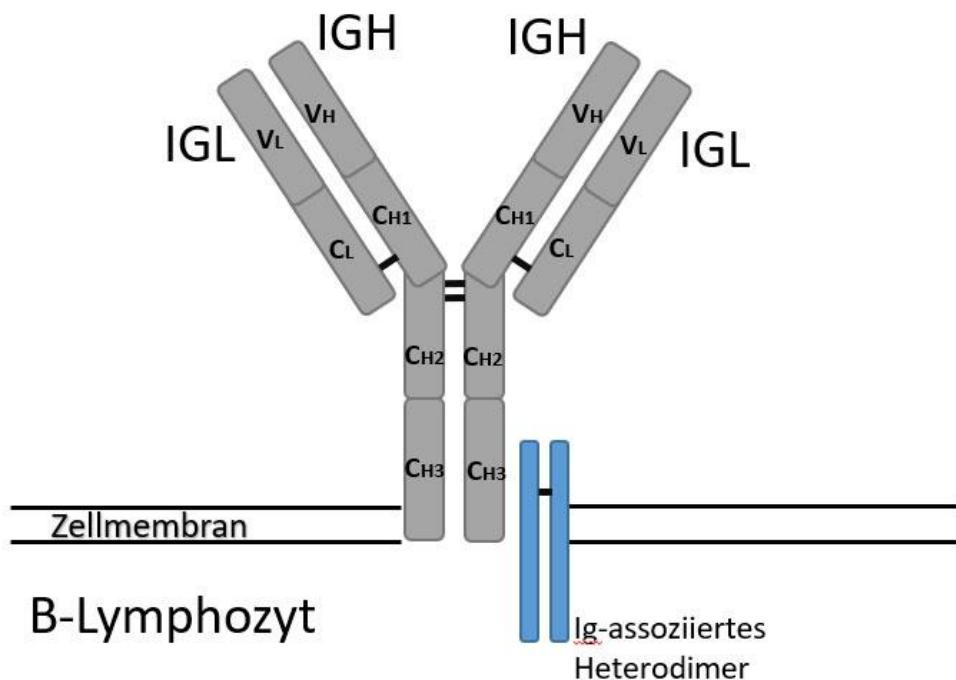


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines membrangebundenen Immunglobulins auf einem B-Lymphozyten. V_H: variabler Anteil von IGH; V_L: variabler Anteil von IGL; C_H: konstanter Anteil von IGH; C_L: konstanter Anteil von IGL. Das Ig-assoziierte Heterodimer ist an der Signalweiterleitung ins Zellinnere beteiligt²³

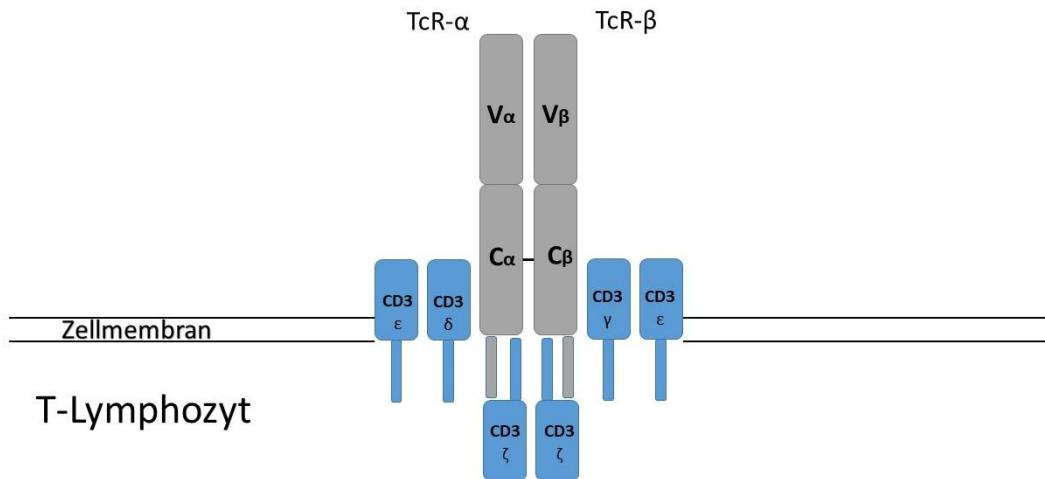
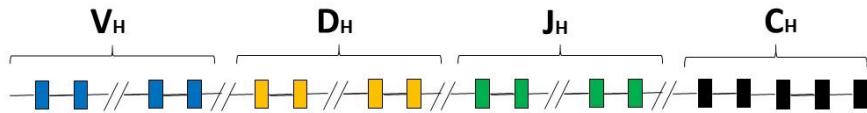


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptors. Va: variabler Anteil von TCR- α ; V β : variabler Anteil von TCR- β . Der CD3-Komplex mit seinen Untereinheiten δ , ϵ , γ und ζ ist an der Signalweiterleitung ins Zellinnere beteiligt²³

Auch in der Diagnostik von Lymphomen sind diese Rezeptorproteine von besonderer Bedeutung, da in über 98% der Lymphomfälle Veränderungen in ihrem Erbgut auftreten, die sich mithilfe von molekularbiologischen Methoden erfassen lassen^{3,30}. Von großer Wichtigkeit in der molekularbiologischen Diagnostik sind die antigenbindenden variablen Bereiche der IG und TCR. Die kodierenden Genabschnitte (Exons) dieser variablen Bereiche werden durch nichtkodierende Abschnitte voneinander getrennt. Die IGH werden kodiert durch eine Kombination von variablen (V), diversity (D) und joining (J) – Genabschnitten. IGL werden lediglich durch V- und J- Abschnitte kodiert (Abb. 5)^{23,31,32}. Auch für die TCR wird nach diesem Mechanismus kodiert, wobei für TCR- β und TCR- δ V-, -D und J- Gene und für TCR- α und TCR- γ V- und J- Gene zur Verfügung stehen (Abb. 6)^{23,33–36}.

Abbildung 5 zeigt die schematische Darstellung humaner IG-Gene der B-Lymphozyten, Abbildung 6 veranschaulicht schematisch den Aufbau humaner TCR-Gene.

Schwere Kette



Leichte Kette

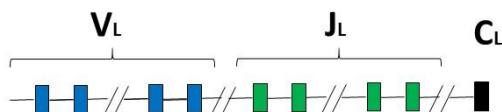


Abbildung 5: Schematische Darstellung humaner IG-Gene der B-Lymphozyten. Die Gene setzen sich jeweils aus einer variablen Anzahl von V-, D- und J- Segmenten, sowie mehreren konstanten C-Segmenten zusammen. Das Gen der schweren Kette besteht aus V-, D-, J- und C-Segmenten. Das Gen der leichten Kette besteht aus V- und J-Segmenten, sowie einem C-Segment

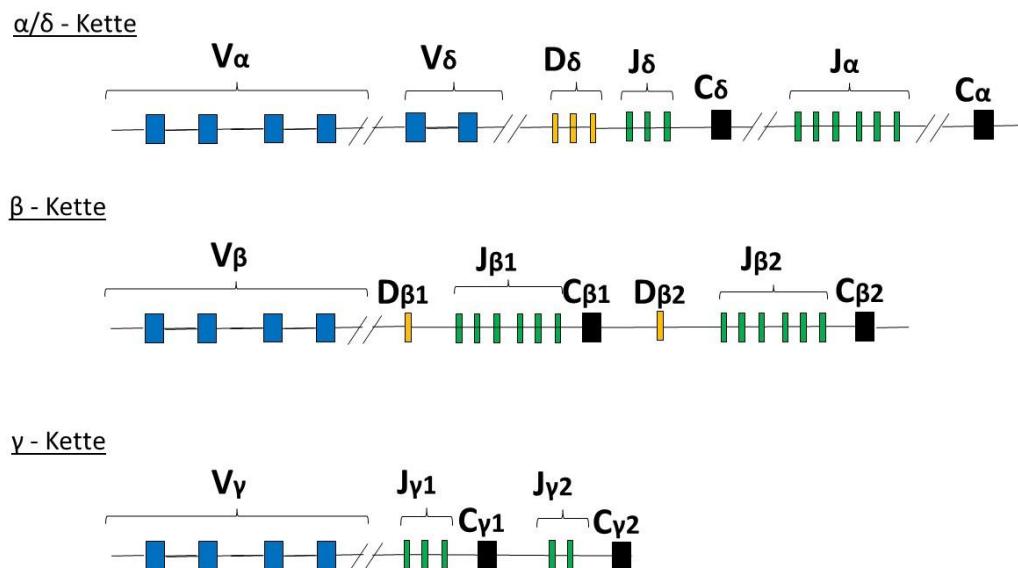


Abbildung 6: Schematische Darstellung humaner TCR-Gene. Auch die TCR-Gene bestehen aus mehreren V-, D- und J- Gensegmenten

Antigene, auf die das Immunsystem adäquat reagieren muss, sind ubiquitär. Um trotz der großen Anzahl möglicher Antigene eine Antigenspezifität zu ermöglichen, ist eine ausgeprägte Vielfalt und Variabilität der Bindungsstellen der IG und TCR erforderlich. Würde es für jedes Antigen eine spezifische Sequenz im Erbgut geben, welche für die erforderlichen Bindungsstellen der IG und TCR kodiert, wäre allein hierfür eine unvorstellbare Menge kodierender DNA erforderlich. Auch müsste nach jedem Kontakt zu einem bisher unbekannten Antigen eine Veränderung im Erbgut stattfinden, um die Information zur Bindung an das bisher unbekannte Antigen zu speichern. Stattdessen findet im Rahmen ihrer Heranreifung ein Rearrangement ihrer V-(D-)J-Gene statt. Durch zufällige Kombination verschiedener V-, (D-) und J- Gene erhält jeder Lymphozyt seine eigene Genkombination und somit seine eigenen, spezifischen IG oder TCR^{31,32}. Hierfür werden Rekombinationssignalsequenzen (engl. recombination signal sequence, RSS), welche die V-, D- und J- Segmente markieren, von den Rekombinaseenzymen RAG1 und RAG2 (recombination activating genes) erkannt und geschnitten³.

Im ersten Schritt wird eines der J-Gene geschnitten und mit einem D-Gen zusammengelagert. Das entstandene D-J-Gen wird daraufhin mit einem V-Gen kombiniert. Im Falle der Leichtkettengene $IG\kappa$ und $IG\lambda$, welche keine D-Gene besitzen,

werden direkt V und J zusammengelagert³. Es entsteht ein einzigartiges Kombinationsgen, welches zur Synthese eines einzigartigen Rezeptors führt.

Abbildung 7 zeigt schematisch den Ablauf der V-D-J-Rekombination eines TCR-β-Gens.

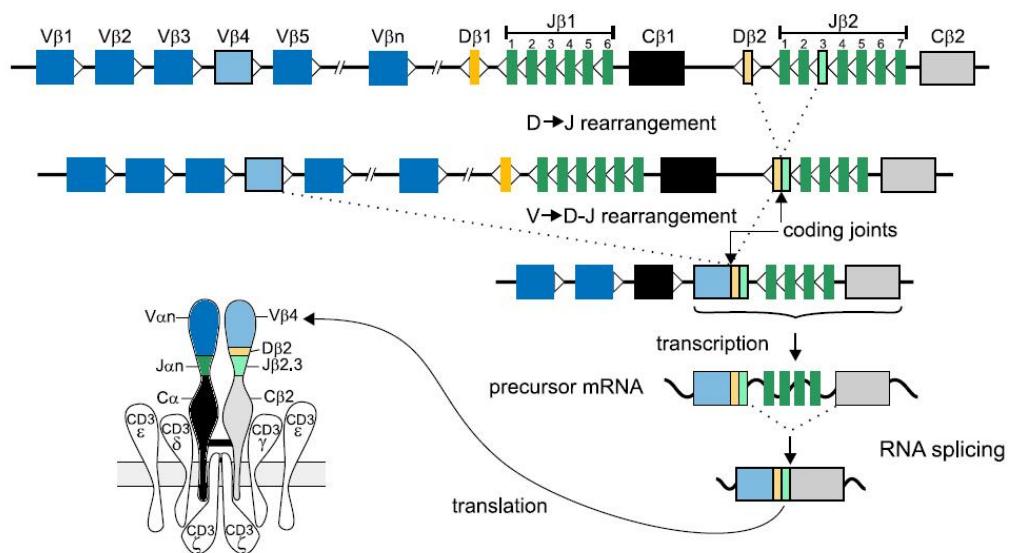


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der V-D-J-Rekombination eines TCR-β-Gens, welches für die β-Kette eines TCR kodiert. In diesem Beispiel wird zunächst im D zu J Rearrangement das D-Gen Dβ2 mit Jβ2.3 zusammengelagert und anschließend im V zu D-J Rearrangement mit Vβ4 zum kodierenden Gen Vβ4-Dβ2-Jβ2.3 kombiniert. Mit diesem wird nun die mRNA transkribiert, welche im Rahmen der Proteinbiosynthese translatiert wird. Daraufhin kann die fertige TCR-β-Kette in den T-Zell-Rezeptor integriert werden; modifiziert nach van Dongen et al., 2003

Durch diese Rekombination entstehen Lymphozyten, die sich in der Zusammensetzung der Antigenbindungsstellen ihrer Ig und TCR zum Teil erheblich unterscheiden³⁰⁻³². Trotz einer begrenzten Anzahl an Genen wird so eine Antikörpervielfalt von über 10^{12} erreicht, welche von den Zellen genutzt werden kann, um Antigene unterschiedlichster Art zu erkennen³.

Reife Lymphozyten können ihre Antigenvielfalt durch somatische Hypermutation, bei der durch eine Punktmutation die V-Region zusätzlich abgeändert wird, noch weiter erhöhen

^{13,23}. Diese Prozesse sind für die unvergleichliche Versatilität des Immunsystems in Hinblick auf die Abwehr verschiedenster Erreger unabdingbar ³⁷. In einer reaktiven, nicht kanzerös veränderten Lymphozytenpopulation finden sich somit Zellen mit unterschiedlichen, sehr heterogenen Rearrangements ihrer IG- oder TCR, wobei der Lymphozytenkロン mit dem passendsten Antigenbindungsverhalten einen Selektionsvorteil erhält und im Sinne einer Gaußschen Normalverteilung am häufigsten vertreten sein wird ³⁸.

Lymphome hingegen sind monoklonal, sie sind also zurückzuführen auf die klonale Vermehrung eines einzelnen entarteten Lymphozyten ³. Somit weisen die Tochterzellen und damit die gesamte entartete Lymphozytenpopulation in den meisten Fällen ein und dasselbe Rearrangement auf, welches sich von der Population der gesunden Lymphozyten unterscheidet und mithilfe moderner molekularbiologischer Verfahren auf genetischer Ebene detektiert und analysiert werden kann ^{38,39}.

2.6 Molekularbiologische Diagnostik von Lymphomen

In der Vergangenheit wurde in der molekularbiologischen Diagnostik von Lymphomen vorrangig die Southern blot-Analyse angewandt, die es ermöglicht, durch Längenbestimmung von Restriktionsfragmenten nach der V(D)J-Rekombination die Klonalität von IG und TCR zu überprüfen. Zwar gilt die Southern blot-Analyse noch immer als zuverlässig, jedoch ist sie zeitaufwändig und benötigt vergleichsweise große Mengen gut erhaltener, hochmolekularer DNA ⁴⁰⁻⁴². In vielen Laboren und pathologischen Instituten wird das Patientenmaterial mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (engl. formalin-fixed paraffin-embedded tissue, FFPE) und dann als FFPE-Block aufbewahrt. Eine Gewebeprobe in FFPE lässt sich aufgrund der Konservierung langfristig einlagern und der Paraffinblock eignet sich gut zum Schneiden dünnster Schnitte für die mikroskopische Untersuchung. FFPE-Gewebe eignet sich jedoch nicht für die Southern blot-Analyse, da Formalin zu einer Fragmentierung der DNA führt. Somit steht keine ausreichende Länge der DNA-Sequenzen für die Southern blot-Analyse mehr zur Verfügung. Verfahren auf Basis einer Polymerasekettenreaktion (PCR) hingegen benötigen deutlich weniger DNA-Material und können daher auch in der Diagnostik von FFPE-Gewebe herangezogen werden.

Zudem haben sich PCR-Verfahren als ähnlich verlässlich und deutlich zeitsparender erwiesen. Daher sind sie vielerorts zum Standard in der Lymphomdiagnostik geworden⁴³. Die PCR ermöglicht zuverlässig und schnell die Vervielfältigung kleiner Mengen DNA. Dies geschieht durch den Einsatz sogenannter Primer. Bei Primern handelt es sich um synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche an eine spezifische, vorgegebene Basensequenz im zu untersuchenden Erbgut binden und dadurch die Vermehrung der DNA initiieren können. Ein Primer kann für nahezu jede erdenkliche Basensequenz hergestellt werden. So gibt es heutzutage eine große Anzahl industriell hergestellter Primer-Assays mit verschiedensten Indikationen^{38,44}. Auch für die Lymphomdiagnostik wurden im Laufe der Zeit viele Primer entwickelt, die nach unterschiedlichen Strategien die Klonalität einer Lymphozytenpopulation überprüfen sollen. Um die Vervielfältigung der DNA durchzuführen, muss ein Primer an eine vorgegebene Basensequenz binden. Dies führt jedoch besonders im Rahmen der Lymphomdiagnostik zu Problemen. Die zufälligen Rearrangements und somatischen Hypermutationen führen oft zu einer Änderung der Basenabfolge der DNA. In der Folge können sich die Bindungsstellen der Primer so stark verändern, dass ein Primer nicht mehr ausreichend stark an die Zielsequenz binden kann und somit die DNA-Sequenz nicht vervielfältigt wird. Die molekularpathologische Detektion der Klonalität des Lymphoms durch die PCR ist in diesem Fall nicht mehr möglich. Dieses Problem führte in der Vergangenheit oftmals zu einer hohen Rate falsch-negativer Ergebnisse⁴⁴. Mit dem Ziel, ein verbessertes Assay für die PCR-basierte Diagnostik von Lymphomen zu entwickeln, schlossen sich zu Beginn der Jahrtausendwende im Rahmen der kollaborativen Biomed-2-Studie insgesamt 47 europäische Institute zusammen. Im Rahmen dieser Studie wurden Primer entwickelt, welche über eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität verfügen sollten, und daher sehr verlässlich klonale Vermehrungen von B- und T-Lymphozyten im Rahmen der Lymphomdiagnostik detektieren sollten. Aus diesem Grund wurden sie durch die Forschungsgruppe Biomed-2 als neuer Standard in der molekularbiologischen Routinediagnostik von NHL vorgeschlagen^{45–47}.

Am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Köln fand die molekularbiologische Diagnostik von Lymphomen bislang auf Basis von B- und T-Zell -Primern statt, welche in den Jahren 1993 und 1996 durch Diss *et al.* bzw. Lorenzen *et al.* entwickelt wurden^{1,2}. Diese Primer hatten sich zu ihrer Zeit als kostengünstig und zuverlässig erwiesen und waren daher bislang die Standardmethode des Instituts. Aus diesem Grund werden diese Primer im Folgenden als Standardprimer bezeichnet, wobei sich hier auf den

bisherigen Standard der Universitätsklinik Köln bezogen wird und nicht auf den generellen Standard in der molekularpathologischen Diagnostik. In dieser Arbeit werden Standardprimer und Biomed-2-Primer miteinander verglichen. Da hierbei die PCR als zentrale Methode zum Tragen kommt, wird im Folgenden näher auf die PCR eingegangen.

2.7 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bereits im Jahr 1985 entwickelt, beruht diese Methode auf einer temperaturgesteuerten, in Zyklen ablaufenden Amplifikation von DNA-Sequenzen. Das zu vermehrende Substrat wird in ein Gemisch gegeben, welches Primer für die gewünschten DNA-Sequenzen, Nukleotide für die Synthese neuer DNA-Stränge, DNA-Polymerase mit Magnesiumchlorid als erforderlichem Cofaktor und ein Puffersystem zur Verhinderung von pH-Schwankungen enthält⁴⁸.

Ein Zyklus beginnt zunächst mit der temperaturabhängigen Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge. Das Gemisch wird daraufhin abgekühlt, um eine Anlagerung (= Annealing) der Primer an ihre komplementären DNA-Abschnitte zu ermöglichen. Diese sogenannte Annealingtemperatur kann sich je nach verwendetem Primer unterscheiden und muss daher angepasst werden. Die Primer bestehen aus vorgefertigten Oligonukleotiden und binden komplementär an ihre Zielsequenz. Durch die Modifikation der Nukleotidsequenzen der Primer lassen sich zielgenau Primer für spezifische DNA-Abschnitte erstellen. Nach erfolgtem Annealing wird das Gemisch erneut erhitzt, bis die optimale Reaktionstemperatur für die DNA-Polymerasen erreicht ist. Auch diese kann je nach verwendeter Polymerase unterschiedlich hoch sein. Die Primer initiieren nun die durch die Polymerasen erfolgende Synthese eines komplementären DNA-Stranges zur vorliegenden Einzelstrang-DNA. Am Ende eines Zyklus ist erneut eine Doppelstrang-DNA entstanden und das Ausgangssubstrat hat sich verdoppelt. Durch zusätzliche Zyklen kann das Substrat weiter vervielfältigt werden. Theoretisch beträgt die Ausbeute einer PCR folgerichtig 2^n , wobei „n“ für die Anzahl der Zyklen steht. In der Praxis geht man jedoch von einer tatsächlichen Ausbeute von ca. 70-80% dieses Wertes aus, da zum einen, insbesondere bei zunehmender Anzahl an Zyklen, die Aktivität der Polymerase mit der Zeit abnimmt und zum anderen auch bei steigender Produktmenge die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass ein Primer wieder auf einen Einzelstrang trifft⁴⁸.

Abbildung 8 zeigt schematisch den Ablauf einer PCR.

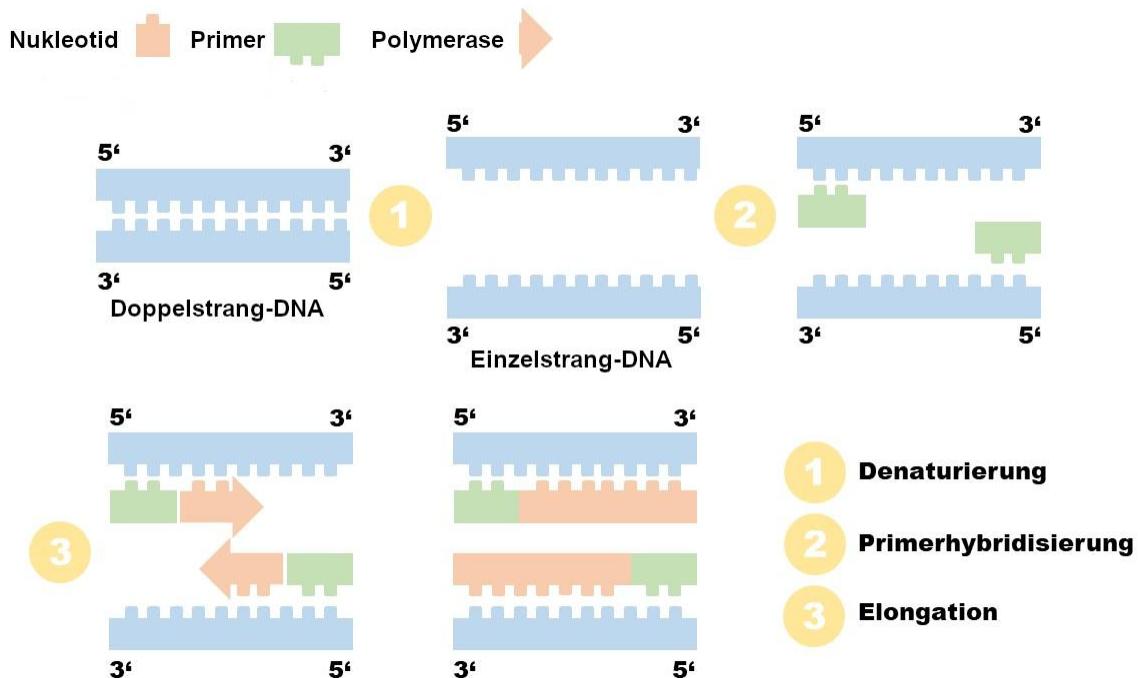


Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR. Der Zielbereich stellt die DNA-Sequenz dar, die durch die PCR vervielfältigt werden soll. Nach der Denaturierung binden die Primer komplementär an die Zielbereiche und initiieren somit Synthese des neuen DNA-Stranges. Danach erfolgt die erneute Denaturierung und der nächste Zyklus kann beginnen; Modifiziert nach Schild, 1997

Die hier dargestellte PCR zeigt die Vervielfältigung eines einzelnen Genabschnitts. Dies wird als Singleplex-PCR bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden Assays auf Grundlage einer Multiplex-PCR verwendet. Im Gegensatz zur Singleplex-PCR beinhalten die jeweiligen Master Mixe hier multiple Primer für die Vervielfältigung unterschiedlicher Genabschnitte. Dadurch können in einem PCR-Vorgang anstelle von nur einem Genabschnitt direkt mehrere Abschnitte untersucht werden.

Aufgrund der vollständigen Automatisierbarkeit der PCR und der damit verbundenen Zeiteffektivität, des relativ unkomplizierten Ablaufs und der dennoch hohen Sensitivität und Spezifität, hat sich die PCR bewährt und ist vor Allem in Hinblick auf die Routinediagnostik regelhaft zur Methode der Wahl geworden.

Mithilfe der PCR können auch Rearrangements der IG und TCR – Gene von Lymphozyten amplifiziert und im Hinblick auf mögliche Klonalität und somit Hinweis auf maligne Entartung untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Biomed-2 Assays³ verwendet und in die Multiplex-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse wurden daraufhin mit denen der Standardprimer-PCR, welche im Vorfeld im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt worden war, verglichen.

Bei Anwendung der Standardprimer ist eine nested-PCR erforderlich. In dieser werden zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt. In der ersten wird mithilfe der eingesetzten Primer die gewünschten DNA – Zielsequenzen amplifiziert. Jedoch findet hierbei aufgrund der Bindungseigenschaften der Standardprimer auch eine unspezifische Primerbindung statt. So bindet ein Primer nicht nur an die gewünschte Zielsequenz. Es kann auch zu einer unerwünschten Bindung an unspezifische DNA-Abschnitte kommen. Diese werden ebenfalls amplifiziert und es entsteht ein unspezifisches Produkt. Besonders häufig geschieht dies im Fall von Probenmaterial, welches einen vergleichsweise geringen Anteil an Zielsequenz-DNA in Relation zur Gesamtmenge an DNA beinhaltet. Bei einer nested-PCR wird daher nach erfolgreicher erster PCR eine kleine Menge des Produkts der PCR entnommen. Diese Probe enthält nun die amplifizierte Zielsequenz, sowie die unspezifischen Produkte, die durch das ungenügende Bindungsverhalten der Primer entstanden sind. Es folgt eine zweite PCR, wobei das hier eingesetzte Primerpaar diesmal an eine Basensequenz bindet, die sich weiter innen in der Zielsequenz befindet. Hierdurch entstehen kleinere Fragmente der Zielsequenz und die unspezifischen Produkte werden nur noch in geringem Umfang amplifiziert. So lässt sich durch diese zweite Reaktion die Spezifität erhöhen.⁴⁹

Der Einsatz der Biomed-2-Primer erfordert keine nested-PCR, eine einzelne PCR ist hier ausreichend.³

Abbildung 9 zeigt schematisch den Ablauf einer nested-PCR.

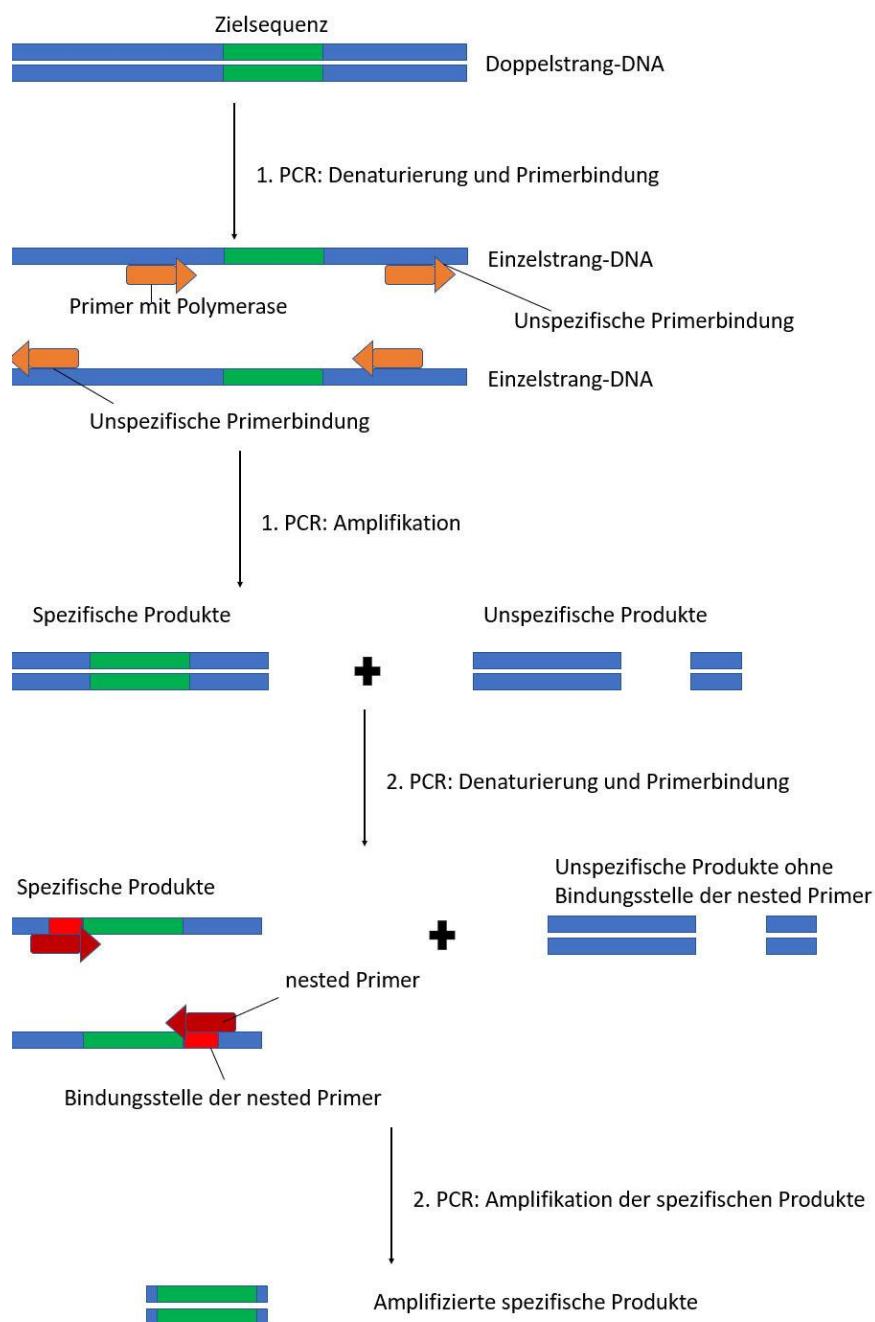


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer nested-PCR. In einer ersten PCR werden nach Denaturierung der DNA die Zielsequenzen der Einzelstränge durch die Primer amplifiziert. Hierbei entstehen jedoch durch unspezifische Primerbindung an anderen Stellen auch unerwünschte unspezifische Produkte. Nach der ersten PCR ist somit ein Gemisch aus den erwünschten, spezifischen Produkten und unspezifischen Produkten entstanden. Im Anschluss findet eine zweite PCR mit zusätzlichen nested Primern statt. Diese binden an eine neue Bindungsstelle, welche sich weiter innen innerhalb der Zielsequenz befindet. Die unspezifischen Produkte besitzen diese Bindungsstelle nicht und werden daher nur noch in äußerst geringem Umfang amplifiziert. Im Anschluss an die zweite PCR sind annähernd nur noch Produkte der erwünschten Zielsequenz übrig.

2.8 Ziel dieser Arbeit

Wie für alle malignen proliferativen Erkrankungen gilt auch für die NHL, dass eine möglichst frühe und sichere Diagnostik maßgeblich den Therapieerfolg beeinflussen kann. Eine frühzeitige Erkennung und Subtypisierung des Lymphoms ermöglicht eine schnellere und auch zielgerichtetere Therapie der Erkrankung. So führt beispielsweise die Therapie des sehr häufigen DLBCL mit dem anti-CD-20-Antikörper Rituximab bei pathologischer Diagnosestellung zu einer deutlich verbesserten 10-Jahres-Überlebensrate, sofern das Lymphom früh genug erkannt wurde⁵⁰. Eine möglichst schnelle und sichere Diagnosestellung ist zur adäquaten Therapieplanung von Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen also von hoher prognostischer Relevanz. Nicht immer gelingt es jedoch, die Diagnose zuverlässig zu stellen. In klinisch nicht eindeutigen Fällen können falsch-negative Ergebnisse in der molekularbiologischen Diagnostik zu Verzögerungen oder gar Fehldiagnosen führen und damit den Behandlungserfolg des Patienten gefährden. Es ist daher von größtem Interesse, eine höchstmögliche Zuverlässigkeit und Sicherheit der molekularbiologischen Diagnostik von NHL zu erreichen.

Im Institut für Pathologie der Uniklinik Köln basiert die molekularpathologische Klonalitätsanalyse im Rahmen der Lymphomdiagnostik auf der PCR. Mit den Standardprimern kam es jedoch wiederholt zu Fällen, in denen zwar klinisch ein hochgradiger Verdacht auf ein Lymphom bestand, der molekularpathologische Nachweis durch die PCR jedoch nicht gelang. In dieser Arbeit wird beschrieben, wie der Einsatz der teureren Biomed-2-Primer im Institut für Pathologie der Uniklinik Köln die diagnostische Sicherheit in schwierigen Fällen maßgeblich erhöhen kann. Hierfür wurde zunächst die PCR mittels Biomed-2-Primern etabliert. Darauffolgend wurden aus der Routinediagnostik Lymphomfälle rekrutiert, die mittels der zwei verschiedenen Primersets einer Klonalitätsanalyse unterzogen wurden. Anschließend wurden die Ergebnisse der beiden Methoden verglichen. Der Vergleich der beiden Methoden erfolgte anonymisiert und ohne patientenbezogene Daten. Da die Klonalitätsanalyse einen zusätzlichen Aspekt im Rahmen der pathologischen Lymphomdiagnostik darstellt, ergaben sich dadurch keine Abweichungen in der Diagnostik oder Therapie.

3. Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz der Biomed-2 – Primer zunächst anhand bekannter Kontrollgruppen etabliert. Anschließend erfolgte die Entwicklung eines Protokolls für die zukünftige Durchführung in der Routinediagnostik.

3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
DNA-Extraktionsautomat Promega Maxwell 16	Promega, Madison, WI, USA
Gelelektrophorese Carl Roth Mini PIUSA Horizontal Elektrophoresekammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kapillarsequenzierer ABI 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler Biometra T Professional TRIO	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
QIAxcel BioCalculator	Qiagen, Venlo, Niederlande

3.2 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien und Hersteller

Reagenz	Hersteller
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane für Elektrophorese TBE-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Borsäure für Elektrophorese TBE-Puffer	VWR BDH Chemicals - Avantor, Center Valley, PA, USA
EDTA für Elektrophorese TBE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose für Elektrophorese	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Elektrophorese Längenstandard Gene Ruler 1kb Plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Elektrophorese DNA Loading-Dye	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
DNA-Positivkontrollen	InvivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA
DNA-Negativkontrollen	InvivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA
DNA-Längenstandard Kapillarelektrophorese	InvivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA
Qiagen Multiplex PCR PlusKit	Promega, Madison, WI, USA
Hot Start Taq-Polymerase	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Taq PCR Master Mix	Qiagen, Venlo, NL
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA – Fluoreszenzfarbstoff PeqGREEN	Avantor, Center Valley, PA, USA
IGH + IGK Klonalitätsassay IdenticClone ABI fluorescence detection	InvivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA
TCRB + TCRG Klonalitätsassay IdenticClone ABI fluorescence detection	InvivoScribe Technologies, San Diego, CA, USA
Maxwell 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification Kit	Promega, Madison, WI, USA
ATL - Puffer	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K 20mg/ml	Promega, Madison, WI, USA

3.3 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial diente FFPE-Gewebe aus dem Institut für Pathologie, Abteilung für Molekularpathologische Diagnostik, der Universitätsklinik Köln. Die Zusammenstellung des Kollektivs erfolgte mithilfe des Archivierungsprogramms PathoPro® und der hauseigenen Filemaker Datenbank. Bei den Fällen des Kollektivs handelte es sich um Lymphomfälle aus der Diagnostik des Instituts, die bereits PCR und eine Klonalitätsanalyse mit den Standardprimern durchlaufen hatten. Die Fälle wurden zufällig aus Klonalitätsanalysen rekrutiert, die zu großen Anteilen nach einer PCR mittels Standardprimer entweder schwer zu interpretieren waren, oder ein polyklonales Ergebnis anzeigen. Hierbei wurden keine Patientendaten herangezogen. Insgesamt wurden 54 Fälle von B-Zell-Erkrankungen und 15 Fälle von T-Zell-Erkrankungen untersucht. Die B-Zell-Erkrankungen teilten sich in 37 Fälle auf, bei denen ein folliculäres Lymphom vorlag und 17 Fälle, bei denen ein DLBCL bestand. Diese Entitäten wurden explizit gewählt, da sie zum einen die häufigsten Subgruppen der Lymphomerkrankungen darstellen^{10,13} und zum anderen, da die molekularpathologische Untersuchung dieser Entitäten nach PCR mit den Standardprimern oftmals keine Klonalität nachweisen konnte oder nur erschwert interpretierbar war. Von den 37 Fällen folliculärer Lymphome mussten acht der geplanten Klonalitätsanalysen aus der Arbeit ausscheiden, da nicht mehr genügend Biopsiematerial für weitere Analysen zur Verfügung stand, sodass letztendlich Klonalitätsanalysen zu 29 Fällen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden 15 Fälle von B-Zell-Lymphomen und 9 Fälle von T-Zell-Lymphomen, die bereits molekularpathologisch eindeutig als monoklonal identifiziert worden waren, als klonale Positivkontrollen eingesetzt. Von den 15 B-Zell-Positivkontrollen mussten vier Fälle aus der Arbeit ausgeschlossen werden, weil nicht mehr genügend Biopsiematerial vorhanden war. Je 15 eindeutig polyklonale B-Zell und T-Zell-Proben wurden als Negativkontrollen herangezogen.

3.4 Methoden

3.4.1. DNA-Isolierung

Die DNA wurde aus FFPE-Gewebe gewonnen. Hierfür wurden aus dem paraffinierten Gewebe mehrere 10µm dicke Schnitte und ein 2 µm dicker Schnitt auf Objektträgern vorbereitet. Der 2 µm Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt und durch einen Pathologen begutachtet. Das lymphomverdächtige Areal wurde nachfolgend durch den Pathologen auf dem Objektträger markiert. Die Leerschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 2x Xylol, 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol und Wasser, für je fünf bis zehn Minuten entparaffiniert und im Wasser rehydriert.

Abbildung 10 zeigt die Entparaffinierung von FFPE-Material mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe.

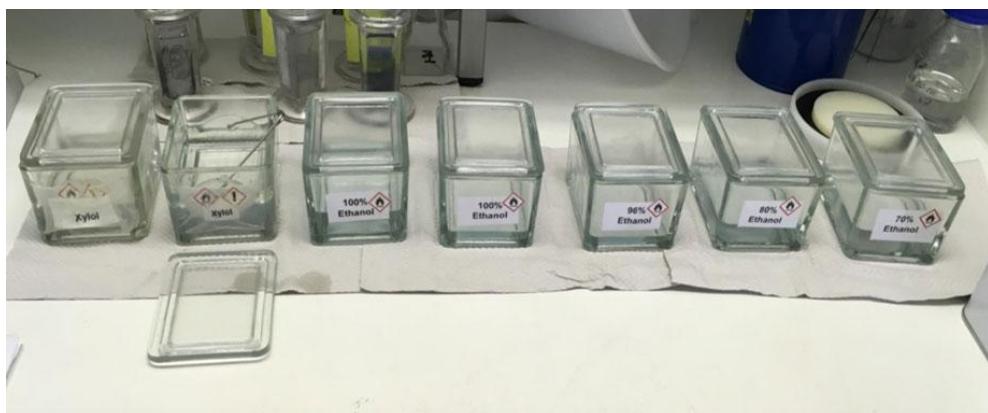


Abbildung 10: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung von FFPE-Material.

Nach der Entparaffinierung wurde das Material gemäß des markierten Areals auf dem HE-Schnitt mithilfe eines Skalpells vom Objektträger entfernt und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, in welchem 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K vorgelegt waren. Der Ansatz wurde folgend 70°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag fand die Extraktion der DNA statt. Dazu wurde der Ansatz mit 400µl Lysepuffer versetzt, durchgemischt und auf die Extraktionskartusche geladen. Die DNA-Extraktion erfolgte vollautomatisch mithilfe des Maxwell 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification Kit im Extraktionsgerät Maxwell 16.

Abbildung 11 zeigt die Entfernung des entparaffinierten HE-Schnitts vom Objektträger zur Überführung in die DNA-Extraktion.



Abbildung 11: Verwendung des markierten Areals vom Objektträger des nun entparaffinierten Materials zur weitergehenden DNA-Extraktion.

3.4.2. Produktnachweis und Qualitätsbestimmung von extrahierter DNA

Zum Produktnachweis und zur Qualitätsbestimmung der extrahierten DNA kam eine Gelelektrophorese zum Einsatz. Diese Methode trennt mithilfe eines elektrischen Feldes geladene Moleküle ihrer Größe nach in einem Agarosegel auf. Die DNA verfügt aufgrund ihrer Phosphatreste über eine negative Ladung und bewegt sich daher im Agarosegel in Richtung der Anode. Kleinere Fragmente durchlaufen das Gel schneller als große und kommen aus diesem Grund nach Ablauf der Zeit näher an der Anode zum Liegen. Dieses Verfahren wurde anstelle modernerer Methoden zum Produktnachweis gewählt, da es eine Abschätzung der DNA-Qualität anhand ihrer Fragmentlängen ermöglicht, anstatt nur die Menge der DNA anzuzeigen. Das Material zur molekularpathologischen Untersuchung liegt meist in Formalin eingebettet als FFPE-Gewebe vor. Eine lange Einbettungszeit im Formaldehyd hat jedoch eine zunehmende Fragmentierung der DNA zur Folge. Die Fragmentierung der DNA in sehr kleine Fragmente kann den Verlust von Primerbindungsstellen zur Folge haben und somit die PCR unmöglich machen. Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann vor Einsatz der DNA in die PCR bereits die Qualität abgeschätzt werden.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden zunächst 2 μ l Loading-Dye in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Einer der Wells wurde zudem mit 1 μ l Längenstandard und 5 μ l destilliertem Wasser gefüllt. Danach wurden jeweils 5 μ l der DNA-Proben auf die Platte aufgetragen. Daraufhin wurden für die Elektrophorese benötigter TBE-Puffer und Agarosegel vorbereitet. Für den Puffer wurden 10,8g TRIS-Base, 5,5g Borsäure und 0,7g EDTA mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt und miteinander verrührt. Nachfolgend wurde das Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde zunächst 1g Agarose abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Im Anschluss wurde der Kolben mit TBE-Puffer auf 100ml aufgefüllt und das Gemisch in der Mikrowelle für zwei Minuten bei 800 W erhitzt und danach mehrfach geschwenkt, um die Agarose vollständig im Puffer zu lösen. Das so entstandene einprozentige Agarosegel wurde mit 3 μ l peqGREEN versetzt, welches als Farbstoff in die DNA interkaliert und so durch seine fluoreszierenden Eigenschaften unter UV-Licht die DNA-Fragmente sichtbar macht. Das gießfertige Gel wurde daraufhin in ein mit Kämmen bestücktes Elektrophoresetray gegossen. Nach einer Polymerisierungszeit von 30 Minuten wurden die Kämme aus dem erstarrten Agarosegel gezogen, wodurch Taschen zur Probenauftragung entstanden. Das fertige Gel wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Nun wurden die mit dem Loading-Dye versetzten DNA-Proben aus der vorbereiteten Platte in die Taschen des Gels pipettiert. Für die Elektrophorese wurde über 40 Minuten eine Spannung von 80-90V eingestellt. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgten Begutachtung und Fotodokumentation unter UV-Licht.

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese zum Produktnachweis.

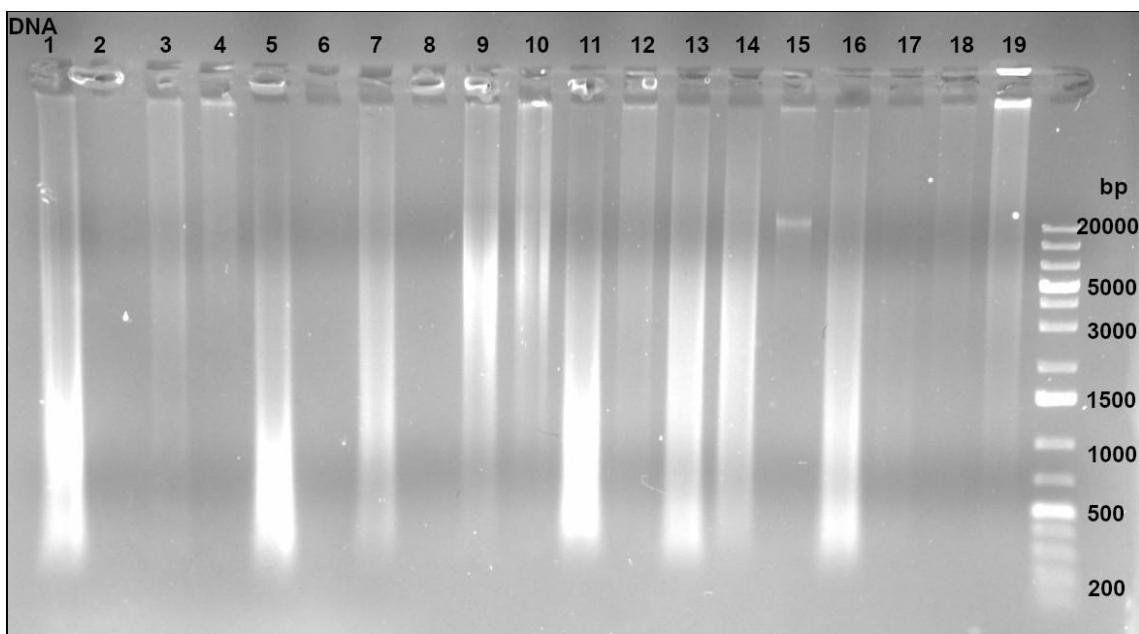


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung einer Gelelektrophorese mit genomischer DNA. Oben im Bild befindet sich die Nummerierung der jeweiligen DNA – Proben. Rechts befindet sich der Längenstandard, welcher Banden in vorgegebener Basenpaarlänge zeigt. In der Gelelektrophorese werden die negativ geladenen DNA-Fragmente ihrer Fragmentlänge nach getrennt. Nach Anfärbung mit peqGREEN werden sie als Bande in dem Agarosegel erkennbar. Kleine Fragmente durchlaufen das Gel schneller und finden sich näher bei der Anode (im Bild unten) wieder. Eine besonders intensive Bande im Bereich der kleinen Fragmente spricht für das Vorhandensein besonders vieler kleiner Fragmente und somit für eine stärkere Fragmentierung der DNA.

3.4.3. PCR

Die extrahierte DNA wurde im nächsten Schritt in die PCR gegeben.

Hierfür kamen folgende PCR-Assays zum Einsatz:

3.4.3.1. B-Zell – Klonalität: Biomed IGH – PCR

B-Zell-Infiltrate wurden zunächst auf eine Klonalität des Schwerkettengens IGH überprüft. Die verwendeten IGH V-J-Assays binden an beide Seiten der V-J Region des IGH-Gens, in welchem im Rahmen der Lymphozytenreifung Rearrangements stattfinden³. Sie bestehen aus drei Ansätzen, die Vorwärtsprimer enthalten, welche an die Regionen FR1, FR2 oder FR3 (engl. framework region) binden, bei denen es sich um konservierte Bereiche in den VH-Gensegmenten handelt.

Die Ansätze beinhalten 6 verschiedene Primer für FR1, sowie je 7 für FR2 und FR3. Als Rückwärtsprimer dient für alle drei Ansätze ein an die JH-Region bindender Konsensusprimer.

In Abbildung 13 sind die Bindungsstellen der FR-Primer auf einem IGH-Gen dargestellt.

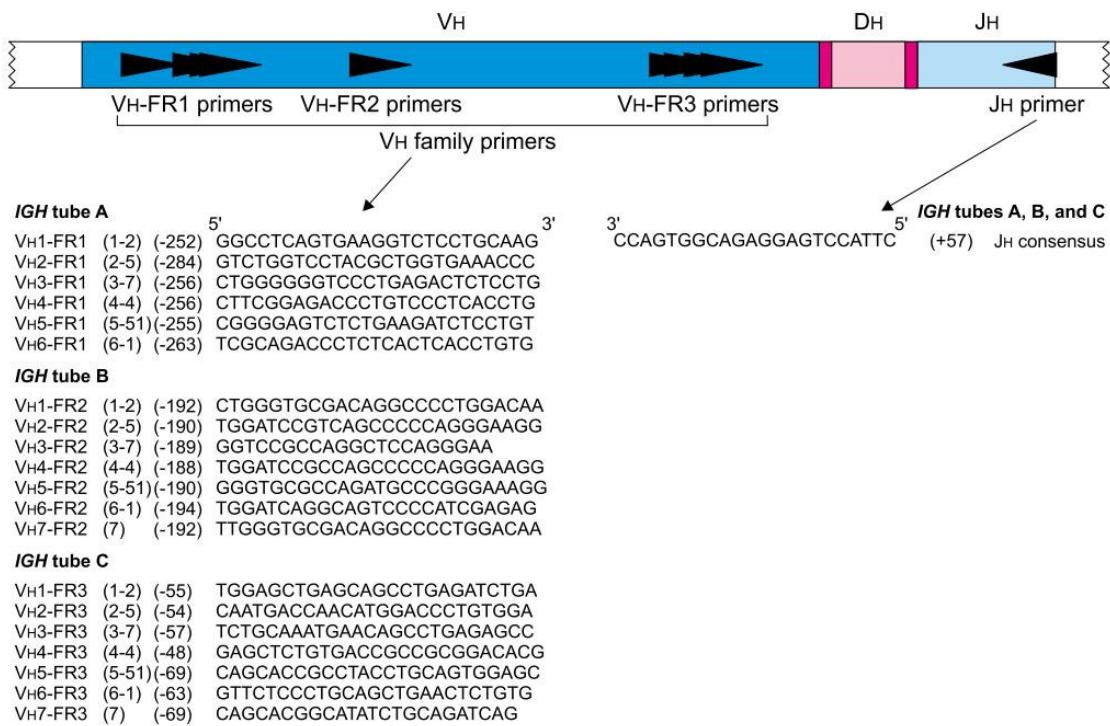


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer auf einem IGH-Gen und Primersequenzen der FR-Primer in ihren jeweiligen Ansätzen (= tubes A-C), sowie Sequenz des Rückwärtsprimers der JH-Region; nach van Dongen et al. 2003.

3.4.3.2. B-Zell Klonalität: Biomed IGK-PCR

Bei ausbleibendem Klonalitätsnachweis schloss sich die PCR der IGK-Gene an. Die IGK-Primer befinden sich in zwei Ansätzen und bestehen aus 6 Vorwärtsprimern für Gene der V_k-Region, einem Vorwärtsprimer für ein als RSS dienendes J_k-C_k-Intron (INTR), sowie einem J_k-Rückwärtsprimer auf dem Kde (= Kappa deleting element)-Gen.

Abbildung 14 veranschaulicht die Primerbindungsstellen der IGK-Primer auf einem IGK-Gen.

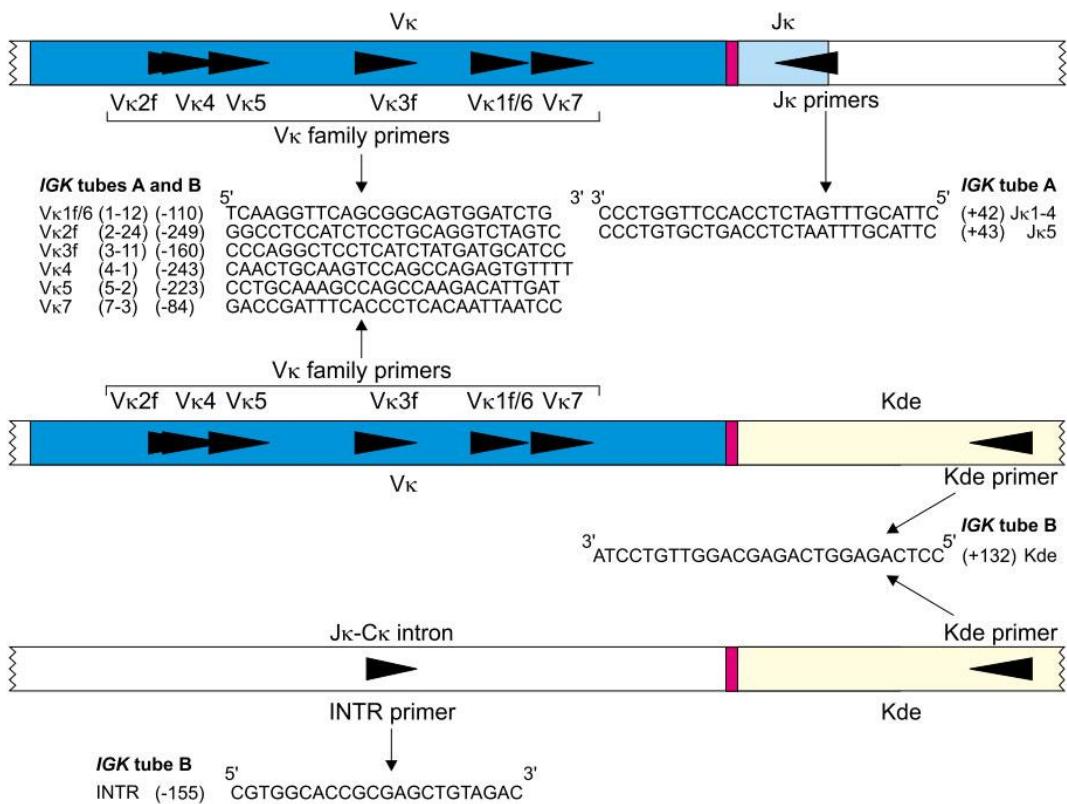


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer der IGK-Gene in den Ansätzen A und B, sowie ihre Primersequenzen; nach van Dongen et al. 2003

3.4.3.3. B-Zell – Klonalität: Standardprimer

Im Rahmen der Standardprimer-PCR der B-Zellen kamen folgende Primersequenzen zum Einsatz:

- Fr2A:** 5'-TGG RTC CGM CAG SCY YCN GG-3'
Fr3A: 5'-ACA CGG CYS TGT ATT ACT GT-3'
LJH: 5'-TGA GGA GAC GGT GAC C-3'
VLJH-Fam (2A): 6-FAM*-5'-GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG-3'
VLJH-Vic (3A): VIC*-5'-GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG-3'

Im ersten Durchlauf der nested-PCR wurden zwei Primer für die Framework-Regionen (Fr2A, Fr3A) und ein Primer für die weiter 3' gelegene Joining-Region (LJH) eingesetzt. Die zweite PCR fand erneut mit den Framework-Primern und zusätzlich weiter 3' gelegenen VLJH-Primern statt. Die VLJH-Primer wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fam bzw. Vic) für die Kapillarelektrophorese markiert.

3.4.3.4. T-Zell Klonalität: Biomed TCRG-PCR

Bei Verdacht auf ein T-Zell-Malignom wurde zunächst die TCRG-PCR durchgeführt.

Abbildung 15 zeigt die TCRG-Primer mit ihren Bindungsstellen auf einem TCRG-Gen.

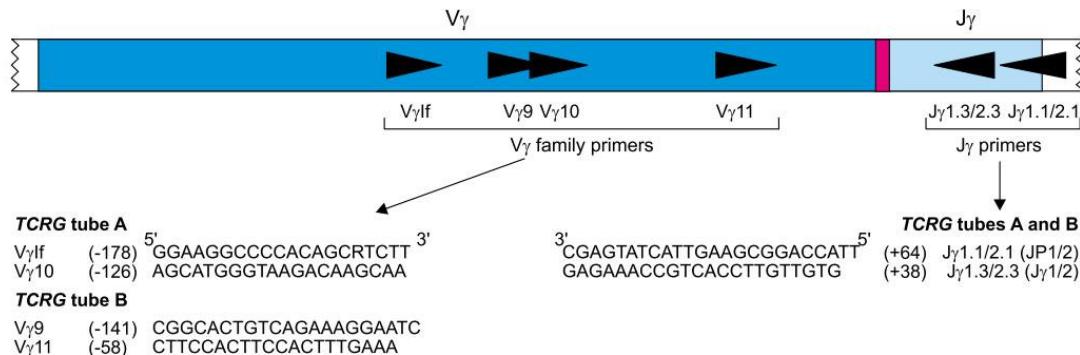


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Primersequenzen und Bindungsstellen an den TCRG-Genen. Die Primer bestehen aus 4 Vorwärtsprimern der V-Region und 2 Rückwärtsprimern der J-Region in insgesamt 2 Tubes; nach van Dongen et al. 2003.

3.4.3.5. T-Zell Klonalität: Biomed TCRB-PCR

Bei ausbleibendem Klonalitätsnachweis schloss sich die TCRB-PCR an. Hierfür standen 23 V β , 13 J β und 2 D β Biomed-Primer zur Verfügung, die sich in drei Ansätzen befanden. Bindungsstellen und Primersequenzen der genutzten TCRB-Primer finden sich in Abbildung 16.

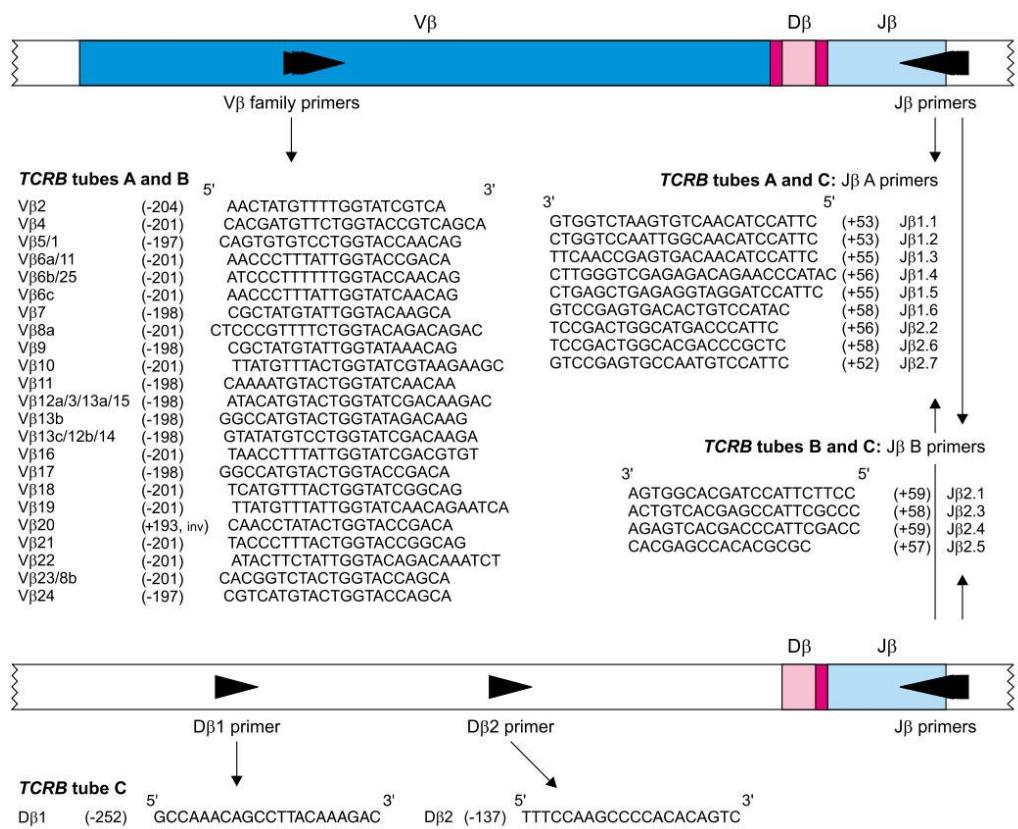


Abbildung 16: Schematische Darstellung der TCRB-Primer mit ihren Sequenzen und Bindungsstellen am TCRB-Lokus in ihren jeweiligen Tubes; nach van Dongen et al. 2003.

3.4.3.6. T-Zell Klonalität: Standardprimer

Die Standardprimer für den Nachweis klonaler T-Zell-Populationen umfasste die folgenden Primersequenzen:

Äußere Primer:

V_γI260: 5'ACT ACT ACT GAA CCT TAT ACA TCC ACT GGT ACC T-3'

V_γII260: 5'CAA CAT CTG TAT ATT GGT ATC G-3'

V_γIII260: 5'CAG ATG TCA TTC ACT GGT ACC G-3'

V_γIV260: 5'GTA AAA TCA TAC ACT GGT ACT G-3'

Innere Primer:

V_γIa120: 5'GCC TTA AAT TTA TAC TGG AAA AT-3'

V_γIb120: 5'GCT GGA TAT TGA KAC TGC AAA AT-3'

V_γII120: 5'CAT CCA CTC TCA CCA TTC ACA AT-3'

V_γIII120: 5'CTC TCA CTT CAA TCC TTA CCA T-3'

V_γIV120: 5'CTT CCA CTT CCA CTT TGA AAT A-3'

J-Region-Primer: 5'-ATG GAA TTC GGA TCC AAC AAG TGT TGT TCC AC-3'

J-Region 2.PCR: NED*-5'-ATG GAA TTC GGA TCC AAC AAG TGT TGT TCC AC-3'

Der erste Durchgang der nested-PCR fand mit den äußereren Primern statt, im zweiten Durchlauf kamen die inneren Primer zum Einsatz.

3.4.3.7. Ablauf der Biomed-PCR

Zur Vorbereitung der PCR mussten die Primermixe zunächst aus dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut werden.

Anfänglich erfolgte die Biomed-PCR nach den Empfehlungen des Herstellers. Hierbei wurden nach Auftauen der Primer für jede Reaktion 45µl des Primermixes abpipettiert.

Es erfolgte für jede PCR eine Reaktion mit als Positivkontrolle dienender DNA, eine Reaktion mit als Negativkontrolle dienender DNA, eine Reaktion mit der Probe-DNA, welche der Klonalitätsanalyse unterzogen werden sollte und eine Kontrolle mit destilliertem Wasser anstelle der DNA-Probe. Letztere diente als Indikator für eventuelle Kontamination durch Fremd-DNA. Somit betrug der zu entnehmende Primermix $4 \times 45\mu\text{l} = 180\mu\text{l}$. Dieser wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden $0,25\mu\text{l}$ DNA-Polymerase pro Reaktion hinzu pipettiert. Die Menge an DNA-Polymerase betrug somit $4 \times 0,25\mu\text{l} = 1\mu\text{l}$. Das Gemisch wurde im Vortexer vorsichtig durchgemischt. Nun wurden für jede Reaktion je $45\mu\text{l}$ des Gemisches abpipettiert und in individuelle Wells einer Reaktionsplatte überführt. Die Wells wurden daraufhin mit für jede einzelne Reaktion je $5\mu\text{l}$ der DNA von entweder Positivkontrolle, Negativkontrolle, Probe-DNA oder destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Gesamtreaktionsvolumen pro Well betrug somit $50\mu\text{l}$.

Die Reaktionsgemische waren für alle Assays, abgesehen von den jeweiligen Primermixen, identisch.

Die so vorbereiteten Platten wurden in den Thermocycler gegeben und die PCR gestartet.

3.4.3.8. Cyclerbedingungen

Es erfolgte der Einsatz in die Thermocycler zur PCR. Tabellen 3 bis 7 zeigen die Cyclerbedingungen der jeweiligen PCR.

Tabelle 3: Cyclerbedingungen der B-Zell Standardprimer 2A. Es erfolgte eine nested-PCR, bei der die erste PCR wie in der Tabelle beschrieben 30 Zyklen umfasste. Die zweite PCR fand mit 50 Zyklen unter denselben Bedingungen statt.

<u>Beschreibung</u>	<u>Zeitangabe</u>	<u>Temperatur</u>
Aktivierungsschritt	7min	95°C
3-Schritt-Zyklus (30 Zyklen)		
Denaturierung	1min	95°C
Annealing	1min	55°C
Extension	1min	72°C
Finale Extension	15min	72°C

Tabelle 4: Cyclerbedingungen der B-Zell Standardprimer 3A. Die beiden Durchläufe der nested-PCR fanden mit jeweils 30 Zyklen statt.

<u>Beschreibung</u>	<u>Zeitangabe</u>	<u>Temperatur</u>
Aktivierungsschritt	7min	95°C
3-Schritt-Zyklus (30 Zyklen)		
Denaturierung	1min	95°C
Annealing	1min	55°C
Extension	1min	72°C
Finale Extension	15min	72°C

Tabelle 5: Cylerbedingungen der T-Zell Standardprimer. Die beiden Durchläufe der nested-PCR fanden mit jeweils 40 Zyklen statt.

<u>Beschreibung</u>	<u>Zeitangabe</u>	<u>Temperatur</u>
Aktivierungsschritt	10min	95°C
3-Schritt-Zyklus (40 Zyklen)		
Denaturierung	30s	95°C
Annealing	30s	72°C
Extension	30s	95°C
Finale Extension	10min	72°C

Tabelle 6: Cylerbedingungen der Biomed B-Zell-Primer.

<u>Beschreibung</u>	<u>Zeitangabe</u>	<u>Temperatur</u>
Aktivierungsschritt	5min	95°C
3-Schritt-Zyklus (35 Zyklen)		
Denaturierung	30s	95°C
Annealing	90s	60°C
Extension	30s	72°C
Finale Extension	30min	68°C
Aufbewahrung	∞	8°C

Tabelle 7: Cylerbedingungen der Biomed T-Zell-Primer.

<u>Beschreibung</u>	<u>Zeitangabe</u>	<u>Temperatur</u>
Aktivierungsschritt	5min	95°C
3-Schritt-Zyklus (35 Zyklen)		
Denaturierung	30s	95°C
Annealing	90s	60°C
Extension	30s	72°C
Finale Extension	30min	68°C
Aufbewahrung	∞	8°C

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Kapillargelelektrophorese im QIAxcell (Qiagen) zum Produktnachweis und zur Qualitätskontrolle der PCR.

3.4.3.9. Modifikation der Biomed-PCR

In mehreren Schritten wurde eine sukzessive Reduktion der Menge des verwendeten Primermix erprobt. Dies erfolgte unter stetiger Qualitätskontrolle der Ergebnisse. Letztlich konnten auch unter Einsatz von 5µl anstelle von 45µl Primermix sowohl im Rahmen der B-Zell-, als auch der T-Zell-Assays zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Das Reaktionsgemisch für die verschiedenen Assays wurde letztendlich wie folgt etabliert:

PCR-Ansatz (25 µl):

5 µl Primermix

12,5 µl Master Mix Qiagen

25 und 50 ng DNA

Ad 25 µl Aqua

Jede PCR wurde doppelt mit unterschiedlichen Mengen an Template-DNA durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand für jede PCR aus 5µl des jeweiligen Primermixes, 12,5µl Taq PCR Master Mix (Qiagen), welcher eine Taq-Polymerase, Nukleotide, Pufferlösung und Magnesiumchlorid enthält, sowie 25ng DNA-Template für die erste PCR bzw. 50ng DNA-Template für die zweite PCR. Durch dieses Duplikat der PCR lässt sich die Sicherheit der späteren Klonalitätsanalyse erhöhen. Der Ansatz wurde daraufhin mit Aqua auf 25µl aufgefüllt.

Die Daten der Standardprimer-PCR stammen aus der vorausgegangenen Routinediagnostik des Instituts. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine PCR mit den Standardprimern mehr durchgeführt.

3.4.4. Klonalitätsanalyse mittels Kapillarelektrophorese

Nach der PCR erfolgte die Klonalitätsanalyse der Proben mittels Kapillarelektrophorese.

Hierfür wurden je Primerpaar 1µl der PCR-Produkte unverdünnt mit 12µl Hi-Di Formamid und 0,25µl Längenstandard auf den ABI Prism 3500 Genetic Analyzer aufgetragen. Durch die Kapillarelektrophorese werden die DNA-Moleküle, ähnlich wie bei der zuvor beschriebenen Gelelektrophorese, in einem elektrischen Feld in einer Polyacrylamidmatrix ihrer Größe nach aufgeteilt. Die zuvor in der PCR durch einen Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente werden durch einen Laser detektiert und durch Vergleich mit einem aufgetragenen Längenstandard kann ihre Länge und Konzentration vollautomatisch berechnet werden. Die Fluoreszenzmarkierung wurde durch den Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) und HEX (Hexachloro-6-carboxy-fluorescein) ermöglicht, welche bereits in den jeweiligen Primermixen enthalten waren. Es erfolgt die graphische Darstellung der Fragmentlängen und ihrer Konzentrationen in Form eines Peakmusters, bei dem die relative Fluoreszensintensität (engl. relative fluorescence units = RFU) auf der Ordinate gegen die Fragmentlänge in Nukleotiden (nt) auf der Abszisse aufgetragen wird. Ist in einem bestimmten Fragmentlängenbereich besonders viel amplifiziertes Material vorhanden, so wird hier eine stärkere Fluoreszenz detektiert. Die PCR wurde nach Etablierung der Biomed-2-Primer stets als Duplikat sowohl mit 25ng DNA als auch mit 50ng DNA durchgeführt. Beide wurden der Kapillarelektrophorese zugeführt. Daraufhin wurden die Peakmuster analysiert und miteinander verglichen. Findet sich ein prominenter Peak einer bestimmten Fragmentlänge, so kann davon ausgegangen werden, dass das durch den betreffenden Primer erfasste Rearrangement in der Großzahl der untersuchten Lymphozyten vorliegt. Tritt ein solcher suspekter Peak in den Fluoreszenzdiagrammen beider Duplikate auf, so ist er reproduzierbar und somit ein starker Indikator für das Vorliegen einer Monoklonalität.

In einer polyklonalen Lymphozytenpopulation hingegen folgen die Fragmentlängen nach Elektrophorese der Gaußschen Normalverteilung.

Abbildung 17 veranschaulicht beispielhaft die Peakmuster einer Fragmentlängenanalyse.

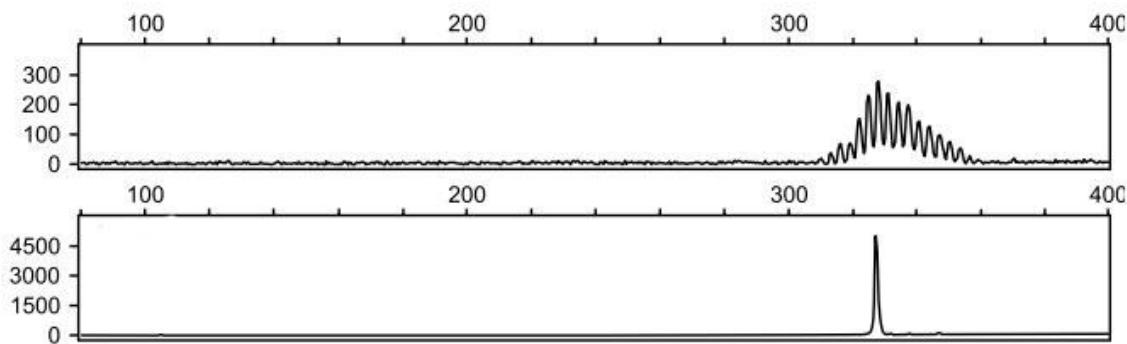


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung des Peakmusters bei der Fragmentlängenanalyse nach Kapillarelektrophorese. Oben: Beispiel für ein polyklonales Verteilungsmuster in typischer Gaußform im Längenbereich von ca. 310-360 Nt. Unten: Beispiel einer Monoklonalität mit einem prominenten, sehr stark fluoreszierenden Peak von über 4500 RFU und einer Fragmentlänge von ca. 325 nt vor einem deutlich verminderten Hintergrund; modifiziert nach van Dongen et al. 2003.

Ist in beiden Diagrammen der DNA-Duplikat entweder ein polyklonales Verteilungsmuster oder kein eindeutiges Peakmuster zu erkennen, so konnte mit dem verwendeten Primeransatz kein Hinweis auf Klonalität gefunden werden. Das Ergebnis wurde somit als nicht klonal oder nicht nachweisbar gewertet. Der Elektrophorese schloss sich die Datenausgabe in Form des beschriebenen Peakmusters an, welches für jede Probe analysiert und auf Klonalität geprüft wurde.

4. Ergebnisse

Zur Überprüfung der Leistung und Verlässlichkeit der Biomed-2-Primer im Vergleich zu den Standardprimern im Institut für Pathologie der Universität zu Köln wurde zunächst eine Kohorte, bestehend aus 54 B-Zell-Lymphomen und 15 T-Zell-Lymphomen, zusammengestellt. Aufgrund ihres häufigen Auftretens unter den Lymphomerkrankungen und bislang oftmals nicht zufriedenstellender Klonalitätsdetektion wurden für die Gruppe der B-Zell-Lymphome DLBCL und folliculäre Lymphome ausgewählt. Die Gruppe der FL bestand aus 37 Fällen, die Gruppe der DLBCL beinhaltete 17 Fälle. Die Gruppen enthielten sowohl Fälle, die mit den Standardprimern schwer interpretierbar waren oder keine Klonalität zeigten, wie auch Kontrollfälle, in denen der Klonalitätsnachweis durch die Standardprimer bereits erfolgreich war.

Als Positiv- bzw. Negativkontrollen dienten vorselektierte Fälle von bereits bekannter Mono- bzw. Polyklonalität.

Anschließend erfolgte ein Vergleich der Standardprimer mit den Biomed-2-Primern in Bezug auf Sensitivität, Spezifität, Falsch-Negativ-Rate und Falsch-Positiv-Rate.

4.1 Ergebnisse der B-Zell – Klonalitätsanalysen

An erster Stelle wurden die Positiv- und Negativkontrollen der B-Zellen überprüft. Tabellen 8 und 9 listet die Ergebnisse der Kontrollfälle auf.

Tabelle 8: Ergebnisse der Positivkontrollen der B-Zellen mittels Biomed-2 – PCR

Nr.	Datum der Biopsie	Diagnose	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
BCM2	10.02.16	DLBCL	klonal	klonal
BCM3	13.01.17	DLBCL	klonal	klonal
BCM4	10.02.17	FL	klonal	klonal
BCM6	01.04.16	FL	klonal	klonal
BCM8	13.10.16	DLBCL	klonal	klonal
BCM9	02.01.15	MCL	klonal	klonal
BCM11	02.03.15	FL	klonal	klonal
BCM12	19.05.15	FL	klonal	klonal
BCM13	05.06.15	DLBCL	klonal	klonal
BCM14	22.06.15	DLBCL	klonal	klonal
BCM15	26.10.15	DLBCL	klonal	klonal

Die Biomed-2 Primer bestätigen die Monoklonalität in 11/11 durchgeführten Kontrollfällen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Negativkontrollen der B-Zellen mittels Biomed-2 – PCR

Nr.	Datum der Biopsie	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
BCP1	16.01.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP2	11.01.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP3	03.02.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP4	09.03.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP5	20.03.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP6	10.03.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP7	31.03.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP8	04.04.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP9	07.04.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP10	19.04.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP11	12.04.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP12	02.05.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP13	16.05.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP14	07.06.17	nicht klonal	nicht klonal
BCP15	30.05.17	nicht klonal	nicht klonal

Die Biomed-2 – Primer bestätigen eine Polyklonalität in 15/15 Kontrollfällen.

4.1.1. Follikuläre Lymphome

Nach Abzug der zuvor genannten acht im Vorfeld ausgeschlossenen Fälle, bei denen nicht mehr genügend Biopsiematerial zur Verfügung stand, wurden insgesamt 29 Fälle folliculärer Lymphome auf Klonalität überprüft (Tabellen 10 und 11, s. 49-50).

Hierbei fand sich in einem Fall am ehesten aufgrund fortgeschrittener Degradierung der DNA nach langer Einlagerungsdauer bei erneuter PCR lediglich unspezifische Produkte,

sodass dieser ebenfalls aus der Arbeit ausgeschlossen werden musste (Tabelle 11, s. 50, Fall BF23). Die letztendliche Gesamtanzahl der überprüften folliculären Lymphome betrug somit 28.

Die Biomed-2-Primer zeigten eine Monoklonalität in 10 von 12 Fällen, bei denen mit den Standardprimern keine Monoklonalität festgestellt werden konnte. Zwei Fälle zeigten weiterhin ein polyklonales Ergebnis.

In 16 von 16 Fällen der B-Zell-Proliferate, die mit den Standardprimern als klonale folliculäre Lymphome bei schwieriger Interpretation der Klonalitätsanalyse eingestuft wurden, konnten die Biomed-2-Primer eine Monoklonalität anzeigen und den Befund somit bestätigen.

Insgesamt ließ sich in der Gruppe der folliculären Lymphome von den 28 untersuchten Fällen in 21 schon nach Analyse der IGH PCR eindeutig eine Monoklonalität nachweisen. Lediglich sieben Fälle benötigten eine weitere Analyse mittels zusätzlicher IGK PCR. In vier dieser Fälle wurde die zusätzliche PCR aufgrund einer nicht eindeutigen Monoklonalität vor einem polyklonalen Hintergrund angeschlossen. In allen vier Fällen zeigte die angeschlossene IGK PCR eine zusätzliche Monoklonalität der untersuchten Targets und konnte so die vermutete Monoklonalität bestätigen (Abb. 18, s. 48). Die anderen drei der sieben erneut untersuchten Fällen deuteten nach Fragmentlängenanalyse der zuerst durchgeführten IGH PCR auf ein polyklonales Ergebnis hin. Die angeschlossene IGK PCR dieser Fälle konnte in einem Fall eine durch die IGH PCR zuvor nicht erkannte Monoklonalität aufdecken. Die IGK PCR der verbleibenden beiden Fälle zeigte nach Fragmentlängenanalyse weiterhin ein polyklonales Ergebnis an.

In Abbildung 18 sind beispielhaft die IGH und IGK Fragmentlängenanalysen des Falls BF16 zu sehen. Abbildung 19 zeigt die Fragmentlängen nach IGH und IGK PCR des Falls BF12.

In Tabelle 10 und 11 sind die Ergebnisse der Klonalitätsanalysen der FL-Fälle nach Standardprimer-PCR und Biomed-2-PCR aufgelistet.

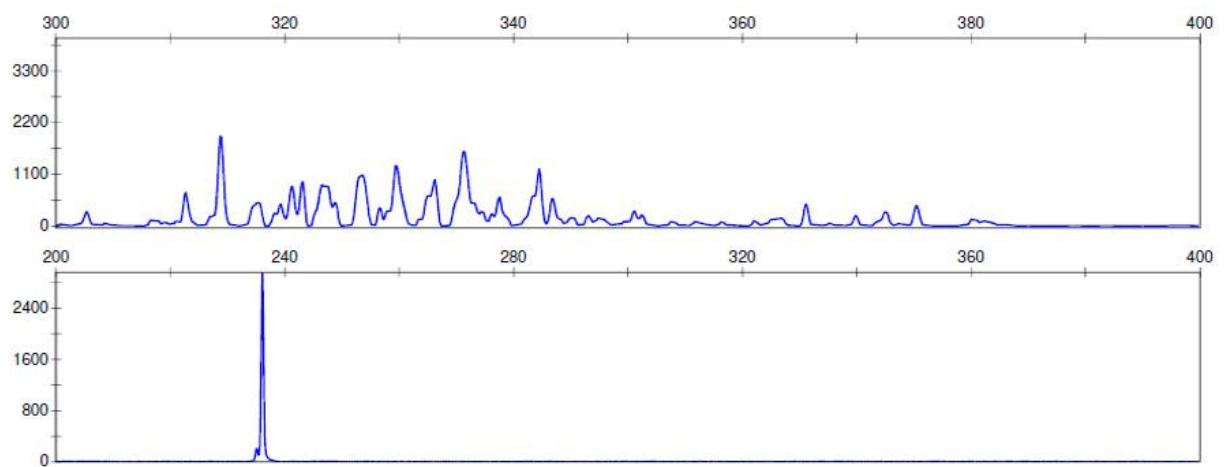


Abbildung 18: Oben: Fragmentlängen Fall BF16, IGH FR1: Die Fragmentlängenverteilung spricht für eine Polyklonalität. Unten: Fragmentlängen Fall BF16, IGK B: In der angeschlossenen IGK – PCR zeigt sich ein deutlicher Peak, welcher mit einer Monoklonalität vereinbar ist.

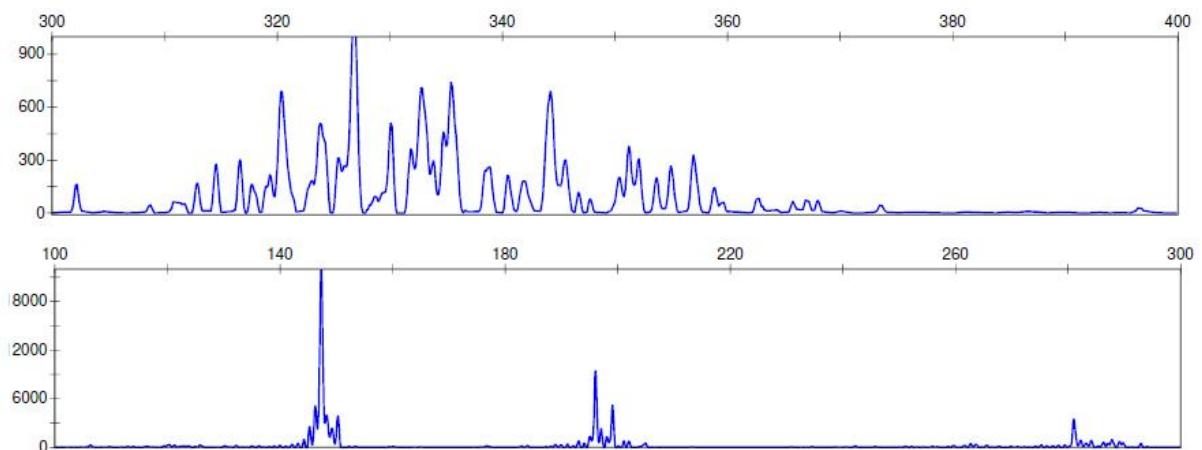


Abbildung 18: Oben: Fragmentlängen Fall BF12, IGH FR1: Die Fragmentlängenanalyse spricht für eine Polyklonalität. Unten: Fragmentlängen Fall BF12 IGK A: Der Peak bei 149Nt ist nach IGK A-PCR regelhaft anzufinden und nicht wegweisend für eine Monoklonalität. Die restlichen Fragmentlängen lassen ebenfalls keine Diagnosestellung einer Monoklonalität zu.

Tabelle 10: Gruppe 1 der folliculären Lymphome im Vergleich der Klonalitätsanalysen mittels Standardprimer und Biomed-2.

Nr.	Datum Biopsie	der Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
BF1	06.01.17	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF2	31.03.17	nicht klonal	klonal
BF5	05.04.16	nicht klonal	klonal
BF7	02.05.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF9	28.07.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF10	18.10.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF11	18.10.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF12	31.10.16	nicht klonal	klonal
BF14	18.12.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF15	07.12.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF16	09.12.16	nicht klonal	klonal
BF17	23.01.15	nicht klonal	klonal
BF18	27.01.15	nicht klonal	klonal
BF19	21.04.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal

Tabelle 11: Gruppe 2 der folliculären Lymphome im Vergleich der Klonalitätsanalysen mittels Standardprimer und Biomed-2.

Nr.	Datum der Biopsie	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
BF20	10.06.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF21	27.07.15	nicht klonal	klonal
BF22	14.08.15	nicht klonal	klonal
BF23	09.09.15	nicht klonal	n.n.
BF24	07.09.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF25	06.11.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF26	16.11.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF27	26.11.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF31	29.10.19	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF32	24.10.19	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF33	19.11.19	nicht klonal	nicht klonal
BF34	11.11.19	nicht klonal	klonal
BF35	18.11.19	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BF36	12.11.19	nicht klonal	klonal
BF37	07.11.19	nicht klonal	nicht klonal

Um die Standardprimer mit den Biomed-2 – Primern zu vergleichen, wurden die Ergebnisse der Klonalitätsanalysen beider Methoden in Vierfeldertafeln aufgetragen, wobei hierfür die Biomed-2 – Primer als Goldstandard gewählt wurden (Abb. 20, s. 51).

Abzüglich der ausgeschlossenen Fälle wurden 28 Follikuläre Lymphome auf Klonalität überprüft. 26 der 28 untersuchten Fälle zeigten mit den Biomed-2-Primern ein monoklonales Rearrangement. Von diesen erkannten die Standardprimer 16 Fälle ebenfalls als monoklonal, in 8 Fällen konnte jedoch nur durch die Biomed-2-Primer, nicht aber durch die Standardprimer eine Monoklonalität gezeigt werden. Im Vergleich mit den Biomed-2-Primern wurden diese divergierenden Resultate der Standardprimer als

falsch-negatives Ergebnis gewertet. In zwei Fällen konnte mit keiner der Methoden eine Klonalität nachgewiesen werden, sodass das Ergebnis der Klonalitätsanalyse der Standardprimer hier als richtig negativ gewertet wurde. Es gab keine Fälle von ermittelter Klonalität durch die Standardprimer bei Nichtklonalität durch die Biomed-2-Primer. Aus den gesammelten Ergebnissen ergibt sich für die Standardprimer im Vergleich mit den Biomed-2-Primern eine Sensitivität von 62% bei einer Falsch-Negativ-Rate von 38%. Da keine positiven Ergebnisse der Standardprimer bei negativen Ergebnissen mit Biomed-2 vorkamen, liegt die ermittelte Spezifität bei 100% ohne falsch-positive Ergebnisse.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Klonalitätsanalysen der Gruppe der follikulären Lymphome nach Auftragen in die Vierfeldertafel. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse und die hieraus errechneten Statistiken tabellarisch dargestellt.

	Standardprimer klonal	Standardprimer nicht klonal
Biomed-2 klonal	16	10
Biomed-2 nicht klonal	0	2

Abbildung 19: Klonalitätsanalysen der Follikulären Lymphome (n=28) in Vierfeldertafel

Tabelle 12: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der Follikulären Lymphome

Fälle	37
Ausgeschlossen	9
Analysiert	28
Monoklonal	26
Polyklonal	2
Standardprimer richtig positiv	16
Standardprimer falsch positiv	0
Standardprimer richtig negativ	2
Standardprimer falsch negativ	10
Sensitivität	62%
Spezifität	100%
Falsch-Negativ-Rate	38%
Falsch-Positiv-Rate	0%

4.1.2. Diffus großzellige Lymphome

Es wurden 17 DLBCL auf Klonalität überprüft. (Tabelle 13, s. 55).

In zwei Fällen waren nach langer Einlagerungsdauer des Zellmaterials mit einer oder beiden Methoden nach erneuter PCR keine spezifischen Produkte mehr nachweisbar. Diese Fälle wurden aus der Arbeit ausgeschlossen, sodass letztendlich 15 Fälle überprüft wurden.

In acht Fällen konnte mit den Standardprimern keine Klonalität nachgewiesen werden. Die Biomed-2-Primer konnten in sieben dieser Fälle ein klastisches Ergebnis aufzeigen. Ein Fall zeigte mit beiden Methoden ein nicht klastisches Ergebnis.

In sechs von sieben Fällen, die mit den Standardprimern als klonal bei schwieriger Interpretation eingestuft worden waren, bestätigten die Biomed-2-Primer die Klonalität. Einer dieser Fälle zeigte mit den Biomed-2-Primern stattdessen ein nicht klastisches Verteilungsmuster.

In den insgesamt 15 untersuchten Fällen diagnostizierter diffus großzelliger Lymphome erhielten wir nach alleiniger Biomed-2-IGH-PCR in 10 Fällen bereits ein monoklastisches Ergebnis. In den fünf Fällen deuteten vier Fälle auf ein polyklastisches Ergebnis hin, in einem Fall fand sich am ehesten eine Monoklonalität vor polyklastalem Hintergrund. In diesen fünf Fällen schlossen wir eine IGK PCR an. Hier erbrachte die zusätzliche PCR in zwei Fällen den Nachweis einer zuvor nicht aufgedeckten Monoklonalität (Abb. 21, s. 53), zwei Fälle blieben bei einem polyklastalen Ergebnis (Abb. 22, s. 53), hierunter befand sich der eine Fall, der zuvor nach PCR mittels der Standardprimer ein klastisches Ergebnis angezeigt hatte. Der verbleibende Fall mit vermuteter Monoklonalität vor polyklastalem Hintergrund wurde zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit ebenfalls einer IGK PCR unterzogen, welche in der Fragmentlängenanalyse jedoch keine Monoklonalität der zusätzlichen Targets anzeigen und den Verdacht auf Monoklonalität somit nicht erhärten konnte. Bei jedoch in Zusammenschau erkennbarer Monoklonalität vor polyklastalem Hintergrund, wurde dieser Fall folgerichtig als klonal gewertet.

In den Abbildungen 21 und 22 sind beispielhaft Fragmentlängenanalysen von zwei repräsentativen Fällen der DLBCL dargestellt.

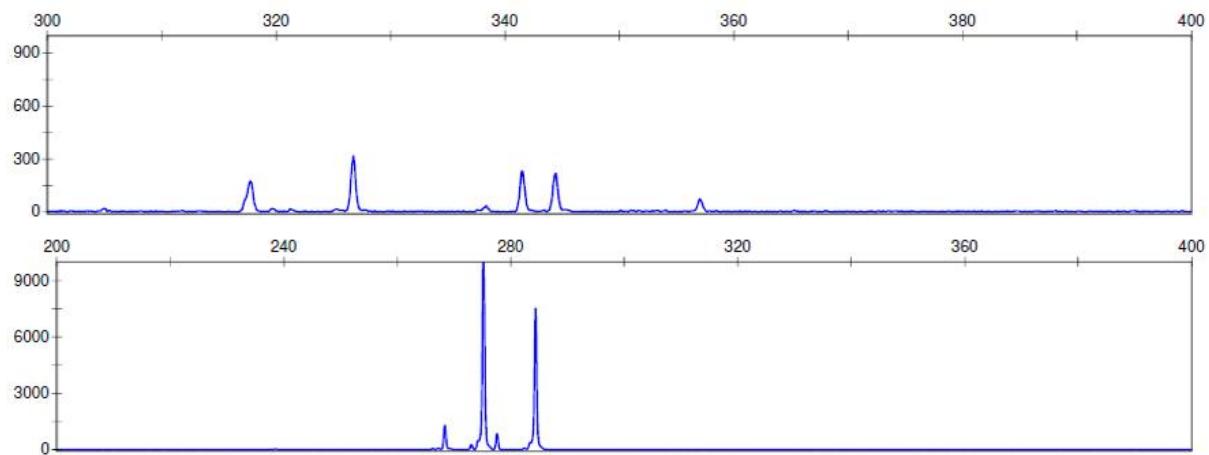


Abbildung 20: Oben: Fragmentlängen Fall BD16, IGH FR1: Es zeigen sich wenige, unspezifische Produkte. Unten: Fragmentlängen Fall BD16, IGK B: Die beiden dominanten Peaks bei 274Nt und 282Nt sind ein typischer Hinweis auf Monoklonalität in der Fragmentlängenanalyse der IGK B-PCR.

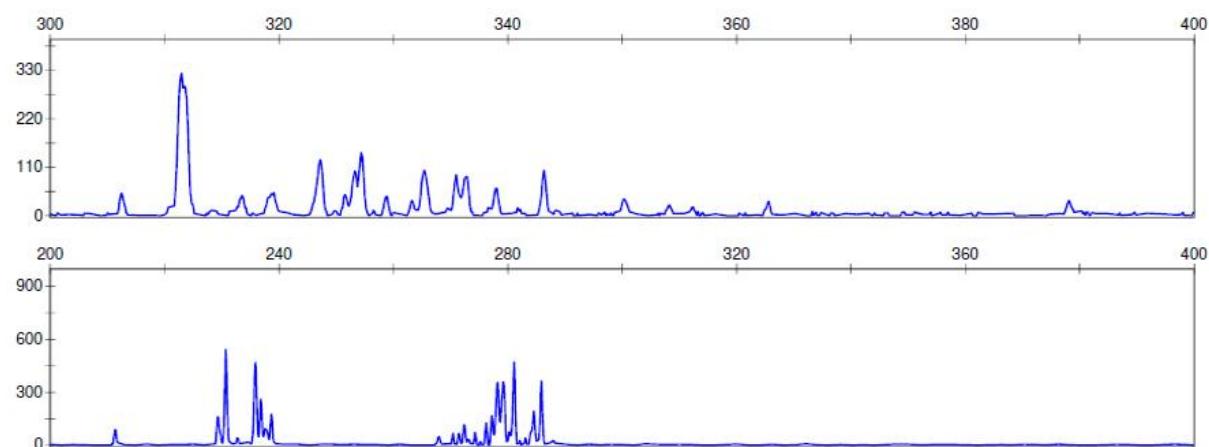


Abbildung 21: Oben: Fragmentlängen Fall BD3, IGH FR1: Nicht auswertbar bei Fluoreszenzintensitäten unter 330 RFU. Unten: Fragmentlängen Fall BD3, IGK B: Es zeigt sich kein dominanter Peak, der Verdacht auf Monoklonalität kann molekularpathologisch nicht bestätigt werden.

Tabelle 13 bietet eine Übersicht über die DLBCL – Fälle und die Ergebnisse ihrer Klonalitätsanalysen.

Tabelle 13: Vergleich der Klonalitätsanalysen der DLBCL mittels Standardprimer und Biomed-2

Nr.	Datum der Biopsie	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
BD1	18.01.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD2	04.03.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD3	15.04.16	nicht klonal	klonal
BD4	02.05.16	nicht klonal	klonal
BD5	08.07.16	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD6	15.07.16	n.n.	n.n.
BD7	02.04.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD8	18.05.15	nicht klonal	klonal
BD9	01.05.15	nicht klonal	nicht klonal
BD10	05.06.15	nicht klonal	n.n.
BD11	15.07.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD12	07.08.15	klonal bei erschwerter Interpretation	nicht klonal
BD13	13.10.15	klonal bei erschwerter Interpretation	klonal
BD14	23.10.15	nicht klonal	klonal
BD15	11.11.15	nicht klonal	klonal
BD16	18.11.15	nicht klonal	klonal
BD17	19.11.15	nicht klonal	klonal

Die untersuchten DLBCL wurden in eine Vierfeldertafel aufgetragen (Abb. 23, s. 56). Von insgesamt 13 als klonal eingestuften Proben, konnten die Standardprimer sechs detektieren. Sieben Fälle zeigten nur mit den Biomed-2-Primern ein klonales Ergebnis. Zwei Fälle zeigten in der Untersuchung mit dem Goldstandard ein negatives Ergebnis. In einem Fall zeigten die Standardprimer eine Klonalität an, welche mit den Biomed-2-Primern nicht nachweisbar war. Werden die Biomed-2-Primer als Goldstandard herangezogen, ergibt sich hieraus ein falsch-positives Ergebnis. Ein Fall wurde sowohl mit Biomed-2 als auch mit den Standardprimern als nicht klonal eingestuft. Aus den gesammelten Ergebnissen errechnet sich somit eine Sensitivität der hausinternen Standardprimer von 46% bei einer falsch-negativ-Rate von 54%. Die ermittelte Spezifität liegt bei 50% mit einer falsch-positiv-Rate von 50%.

Abbildung 23 zeigt die Vierfeldertafel der DLBCL, Tabelle 14 ihre Ergebnisübersicht und statistische Auswertung.

	Standardprimer klonal	Standardprimer nicht klonal
Biomed-2 klonal	6	7
Biomed-2 nicht klonal	1	1

Abbildung 22: Klonalitätsanalysen der DLBCL (n=15) in Vierfeldertafel

Tabelle 14: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der DLBCL

Fälle	17
Ausgeschlossen	2
Analysiert	15
Monoklonal	13
Polyklonal	2
Standardprimer richtig positiv	6
Standardprimer falsch positiv	1
Standardprimer richtig negativ	1
Standardprimer falsch negativ	7
Sensitivität	46%
Spezifität	50%
Falsch-Negativ-Rate	54%
Falsch-Positiv-Rate	50%

4.2 T-Zell – Lymphome

An erster Stelle wurden Positiv- und Negativkontrollen herangezogen und in die Biomed-2-PCR eingegeben, um diese zu überprüfen.

Tabellen 15 und 16 listen die Ergebnisse der Kontrollgruppen auf.

Tabelle 15: Ergebnisse der Positivkontrollen der T-Zellen mittels Biomed-2-PCR

Nr.	Datum der Biopsie	Diagnose	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
TCM1	16.01.17	CD8-Leukämie	klonal	klonal
TCM2	22.05.17	T-Lymphom	klonal	klonal
TCM3	15.01.16	TCR-Klonalität	klonal	klonal
TCM4	27.01.16	T-Lymphom	klonal	klonal
TCM5	04.03.16	B+T-Lymphom	klonal	klonal
TCM6	01.09.16	T-Lymphom	klonal	klonal
TCM7	12.12.16	T-Lymphom	klonal	klonal
TCM8	18.02.15	T-Lymphom	klonal	klonal
TCM9	14.03.15	T-Lymphom	klonal	klonal

Tabelle 16: Ergebnisse der Negativkontrollen der T-Zellen mittels Biomed-2-PCR

Nr.	Datum der Biopsie	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
TCP1	11.01.17	nicht klonal	oligoklonal
	07.02.17	nicht klonal	nicht klonal
TCP2	16.02.17	nicht klonal	nicht klonal
	09.03.17	nicht klonal	nicht klonal
TCP4	20.03.17	nicht klonal	nicht klonal
	31.03.17	nicht klonal	nicht klonal
TCP6	19.04.17	nicht klonal	nicht klonal
	02.05.17	nicht klonal	nicht klonal
TCP8	27.04.17	nicht klonal	nicht klonal
	16.05.17	nicht klonal	oligoklonal
TCP10	19.05.17	nicht klonal	nicht klonal
	19.05.17	nicht klonal	oligoklonal
TCP12	07.06.17	nicht klonal	nicht klonal
TCP13			

Für die Gruppe der T-Zellen wurden größtenteils Fälle herangezogen, bei denen klinisch und histologisch der dringende Verdacht auf ein T-NHL bestand, die jedoch mit den Standardprimern keine oder nur eine erschwert nachweisbare Klonalität zeigten. Es waren zunächst 15 Fälle zur Klonalitätsanalyse vorgesehen, von denen jedoch drei Fälle ausgeschlossen werden mussten. In einem Fall stand nur noch so wenig Probenmaterial zur Verfügung, dass keine Biomed-2-PCR durchgeführt werden konnte. In zwei Fällen fanden sich bei langer Einlagerungszeit nach Biomed-2-PCR keine spezifischen Produkte. Es erfolgte die Analyse der verbleibenden 12 Fälle.

Die Standardprimer wiesen in zwei Fällen auf eine Klonalität hin, in zehn Fällen konnte keine Klonalität nachgewiesen werden. Durch die Biomed-2-Primer konnten neun Fälle als klonal eingestuft werden, sieben dieser Fälle zeigten nur mithilfe der Biomed-2-Primer einer Klonalität, nicht aber mit der Standardmethode. In drei Fällen war mit beiden Methoden keine Klonalität nachweisbar.

In der Kohorte der zwölf suspekten T-Zell-Populationen fand sich nach alleiniger TCRG-PCR bereits in neun Fällen ein monoklonales Ergebnis, drei Fälle wiesen auf eine Polyklonalität hin. Bei einem dieser Fälle wurde eine TCRB-PCR angeschlossen, welche weiterhin ein polyklonales Verteilungsmuster aufwies. Die anderen beiden Fälle ließen aufgrund von nicht ausreichendem DNA-Material keine weitere PCR zu.

Abbildung 24 zeigt beispielhaft die Fragmentlängenverteilung nach Analyse des Falls T6, in welchem keine Monoklonalität gefunden werden konnte. In Tabelle 17 ist die Ergebnisübersicht der T-Zell-Analysen dargestellt.

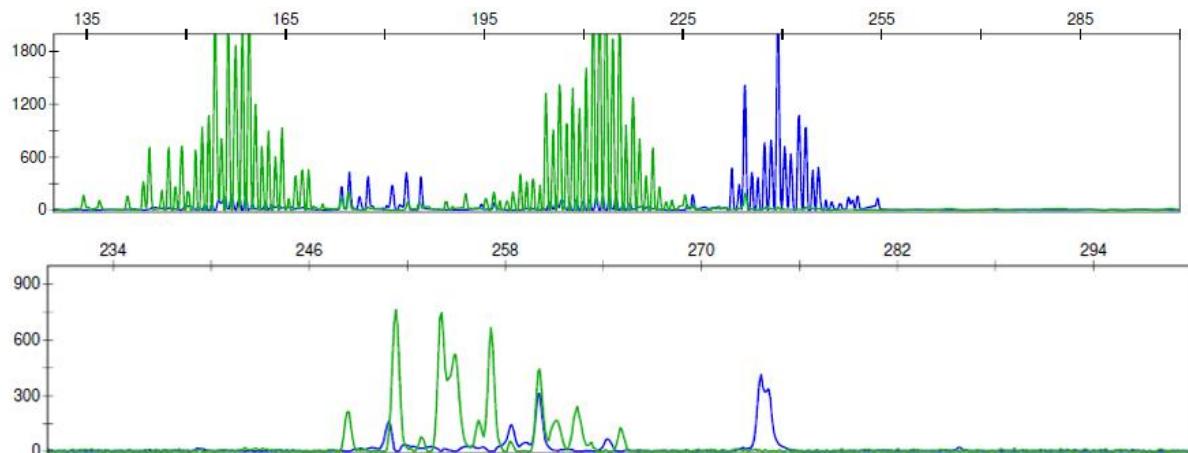


Abbildung 23: Oben: Fragmentlängen Fall T6, TCRG A: Peakmuster vereinbar mit Polyklonalität. Unten: Fragmentlängen Fall T6, TCRB A: Auch in der angeschlossenen TCRB-PCR lässt sich keine Monoklonalität aufdecken.

Tabelle 17: Vergleich der Klonalitätsanalysen der T-Zellen mittels Standardprimer und Biomed-2

Nr.	Datum der Biopsie	Klonalität Standardprimer	Klonalität Biomed-2
T1	07.03.17	klonal	klonal
T3	25.01.17	klonal	klonal
T4	09.01.17	nicht klonal	klonal
T5	16.02.17	nicht klonal	klonal
T6	11.04.17	nicht klonal	n.n.
T7	06.04.17	nicht klonal	klonal
T8	23.08.17	nicht klonal	nicht klonal
T9	25.01.16	nicht klonal	nicht klonal
T10	17.02.16	nicht klonal	n.n.
T11	11.04.16	nicht klonal	klonal
T12	18.07.16	nicht klonal	nicht klonal
T13	04.08.16	nicht klonal	klonal
T14	05.08.16	nicht klonal	klonal
T15	02.11.16	nicht klonal	klonal

Die Ergebnisse der T-Zell-Analysen wurden anschließend in eine Vierfeldertafel aufgetragen und anhand dieser statistisch ausgewertet.

Insgesamt zeigten neun Fälle ein klonales Ergebnis, hiervon konnten lediglich 2 mit der Standardmethode nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich für die Standardmethode eine Sensitivität von 22% bei einer Falsch-Negativ-Rate von 78%. In drei Fällen war mit beiden Methoden keine Klonalität nachweisbar. Es gab keine Fälle, in denen mittels Standardprimer eine Klonalität nachgewiesen wurde, die nicht mit den Biomed-2-Primern gezeigt werden konnte. Dies entspricht einer Spezifität von 100% und einer Falsch-Positiv-Rate von 0%.

Tabelle 18 zeigt die Fälle in die Vierfeldertafel aufgetragen, Tabelle 19 stellt die statistische Ergebnisübersicht tabellarisch dar.

Tabelle 18: Klonalitätsanalysen der T-Zell-Lymphome in Vierfeldertafel

	Standardprimer positiv	Standardprimer negativ
Biomed-2 positiv	2	7
Biomed-2 negativ	0	3

Tabelle 19: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der T-Zell-Lymphome

Fälle	15
Ausgeschlossen	3
Analysiert	12
Monoklonal	9
Polyklonal	3
Standardprimer richtig positiv	2
Standardprimer falsch positiv	0
Standardprimer richtig negativ	3
Standardprimer falsch negativ	7
Sensitivität	22%
Spezifität	100%
Falsch-Negativ-Rate	78%
Falsch-Positiv-Rate	0%

5. Diskussion

Seit ihrer Entwicklung durch die internationale Forschungsgruppe EuroClonality im Jahr 2003³ konnten sich die Biomed-2-Primer in vielfältigen Studien durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnen und wurden vielerorts als Standardmethode in der molekularpathologischen Lymphomdiagnostik etabliert⁵¹.

Bislang wurden am Institut für Pathologie der Uniklinik Köln die erwähnten, durch Diss *et al.*¹ bzw. Lorenzen *et al.*² beschriebenen Methoden zur Detektion eines monoklonalen Rearrangements im Rahmen maligner B- und T-Zell Populationen, angewandt. Diese zeichnen sich vor allem durch schnelle und günstige Verfügbarkeit aus. Zudem hat sich diese Methode in langjährigem Einsatz unter der Verwendung von FFPE-Gewebe als zuverlässig erwiesen. Es kam jedoch, insbesondere bei der Analyse vermuteter folliculärer B-Zell Lymphome, diffus großzelliger B-Zell Lymphome und auch suspekter T-Zell Proliferationen, wiederholt zu Fällen, in denen eine eindeutige Klonalitätsanalyse nicht zweifelsfrei möglich war. Hier konnte die PCR entweder keine nachweisbaren Fragmente erzeugen, oder aber die Fragmentlängenanalyse sprach für ein polyklonales Ergebnis, obwohl klinisch weiterhin der hochgradige Verdacht auf ein Lymphom bestand. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Klonalitätsanalyse im Rahmen der Lymphomdiagnostik eine unterstützende bzw. bestätigende Funktion einnimmt. Ein Klonalitätsnachweis erhärtet die Lymphomdiagnose, ein fehlender Klonalitätsnachweis schließt ein Lymphom jedoch nicht aus. Die Diskrepanz zwischen klinischem Bild eines Lymphoms aber dennoch Nichtnachweisbarkeit eines monoklonalen Rearrangements nach PCR mittels Standardprimer beruht oftmals auf der Entstehung somatischer Hypermutationen, welche gerade bei Lymphomen im Rahmen der Onkogenese besonders häufig auftreten können. Durch diese Mutationen kommt es zu einer Änderung der Basenabfolge in der DNA der betreffenden lymphatischen Zellen. Diese Änderung kann die Zielsequenzen der eingesetzten Primer betreffen und somit in einem Verlust der Primerbindungsstellen resultieren. In der Folge kann der Primer nicht mehr an die vorgesehene Sequenz binden und somit kann eine PCR die Zielsequenz nicht amplifizieren^{3,52}.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob die Biomed-2-PCR die Qualität der Klonalitätsanalysen im Rahmen der Lymphom-Diagnostik am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Köln verbessern kann. In dieser Arbeit wurde der Großteil der Kohorten gezielt aus Fällen rekrutiert, bei denen die Fragmentlängenanalyse der PCR mit den

Standardprimern bereits in der Routinediagnostik keine zufriedenstellende Diagnosesicherheit erreicht hatte. So sollte verglichen werden, ob sich die Verlässlichkeit der Klonalitätsanalysen dieser bekanntermaßen schwierigen Fällen durch den Einsatz der teureren Biomed-2-Primer verbessern lässt. Hierfür wurde zunächst die Biomed-2-PCR etabliert. Daraufhin wurden die ausgesuchten Fälle, die bereits die Routinediagnostik mit den Standardprimern durchlaufen hatten, mit den Biomed-2-Primern analysiert und auf die Kapillarelektrophorese aufgetragen.

Für die Auswahl der zur Verfügung stehenden Primer hielten wir uns zunächst an den von van Dongen *et al.* vorgeschlagenen diagnostischen Algorithmus, welchen wir jedoch im Verlauf abänderten.

Abbildung 25 zeigt den von van Dongen *et al.* vorgeschlagenen diagnostischen Algorithmus.

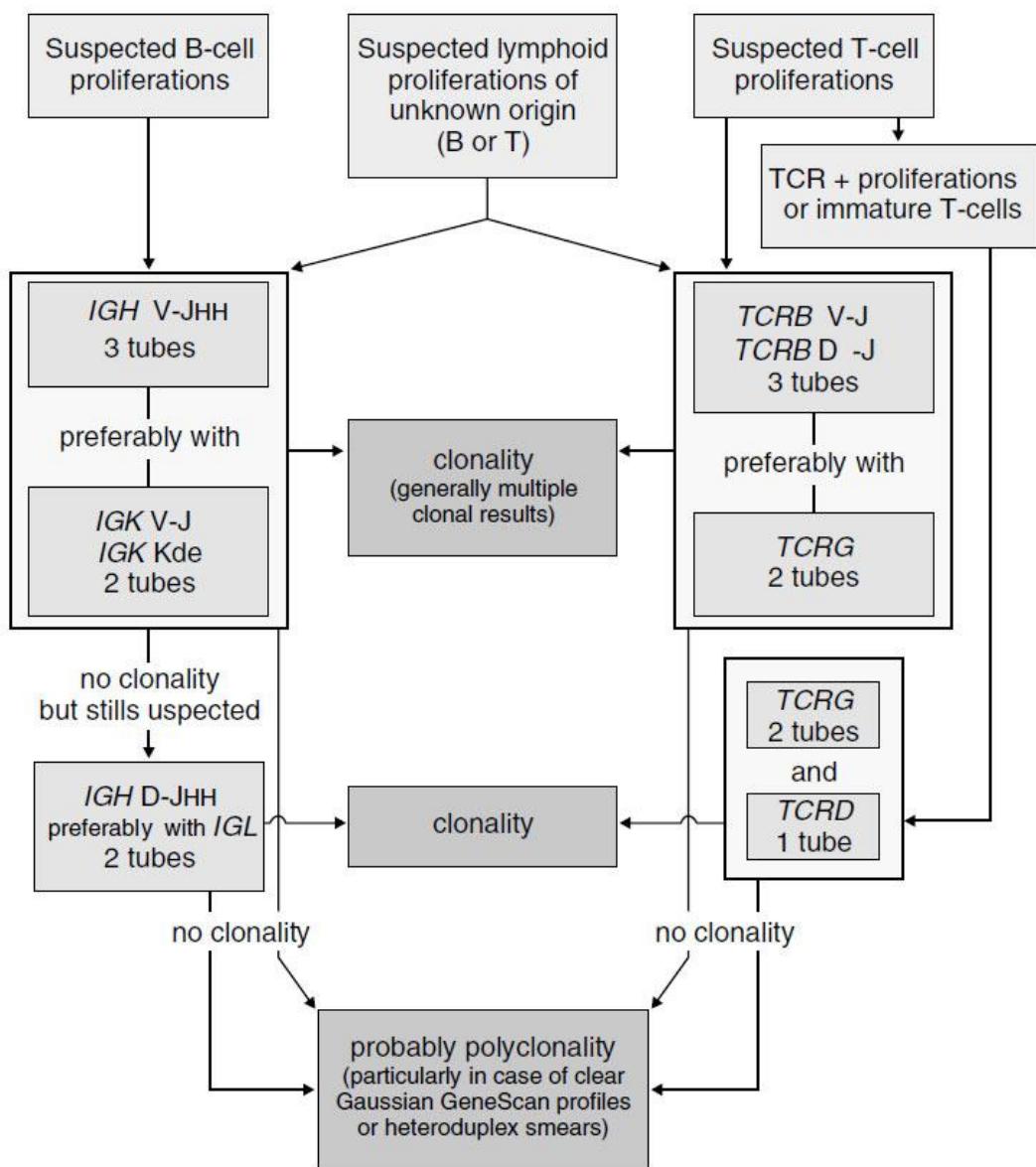


Abbildung 24: Diagnostischer Algorithmus zur Klonalitätsanalyse suspekter Lymphoproliferationen. Bei Verdacht auf B-Zell-Proliferationen schlagen van Dongen et al. bevorzugt die PCR mit *IGH* V-J Primern simultan mit *IGK* V-J Primern vor. Lässt sich keine Klonalität zeigen, so schließt sich die Analyse mit *IGH* D-J und *IGL* Primern an. Ist auch hier keine Klonalität nachweisbar, kann von einer Polyklonalität ausgegangen werden. Im Falle eines Verdachts auf T-Zell-Proliferationen wird die simultane PCR mit den zur Verfügung stehenden *TCRB* und *TCRG* Primern empfohlen. Besteht Verdacht auf eine Proliferation unreifer T-Zellen, so wird die PCR mit *TCRG* und *TCRD* Primern durchgeführt. Ist nicht klar, welchen Ursprungs die Zellproliferation ist, so wird sowohl nach B-Zell-, als auch nach T-Zell Proliferationen gefahndet; nach van Dongen et al. 2007.

Van Dongen *et al.* empfehlen die Durchführung der Analysen mit IGH und simultan IGK im Falle eines Verdachts auf B-Zell-Proliferation, bzw. mit TCRB und gleichzeitig TCRG bei Verdacht auf T-Zell-Proliferation. Diese parallelen Analysen werden durch die Zeitersparnis bei Uneindeutigkeit bzw. Negativität in der Klonalitätsanalyse eines Primersatzes bei weiterhin bestehendem Verdacht auf Monoklonalität begründet⁵³. Zweifelsohne bietet die Analyse der zusätzlichen Targets auch die Möglichkeit, klonale Veränderungen aufzudecken, die bei der PCR nur eines Targets entgangen wären. Dennoch ist hierbei zu bedenken, dass in Deutschland lediglich die Analyse mit einem einzelnen Assay durch die Krankenkassen erstattet wird. Zusätzliche Assays sind vom durchführenden Institut zu tragen. Die simultane Durchführung der PCR mit den Kits für IGH und IGK bzw. TCRG und TCRB würde mindestens zwei Analysen bedeuten. Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Köln wird zudem standardmäßig ein Duplikat im Sinne eines weiteren Ansatzes mit einer größeren Menge Probe-DNA durchgeführt. Demzufolge hätte das Institut die Kosten von drei der vier Analysen selbst zu tragen. Daher haben wir uns entschieden, im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit und Handhabbarkeit im Falle einer Einführung der Biomed-2-Primer in die Routinediagnostik die PCR zunächst auf ein Assay zu beschränken und weitere Assays nur im Falle zweifelhafter oder polyklonaler Ergebnisse anzuschließen. Hierdurch sollte herausgefunden werden, wie oft die Analyse der zusätzlichen Targets der anderen Assays notwendig wird.

Wir haben uns hierzu bei Verdacht auf eine B-Zell Neoplasie in erster Linie für den Einsatz der IGH V-J Primer der FR1, FR2 und FR3-Regionen entschieden, da diese nach Evans *et al.* mit einer Detektionsrate von 84% für FL und 79% für DLBCL über eine sehr hohe Zuverlässigkeit verfügen und somit in der Lage sind, bereits den Großteil möglicher klonaler B-Zell-Populationen zu detektieren⁴⁷. Zudem findet im Rahmen des VDJ-Rearrangements der B-Lymphozyten an erster Stelle ein Rearrangement der Schwerkettengene IGH statt. Darauf folgt das IGK-Rearrangement.

Aus dieser Reihenfolge resultiert entweder die Expression der schweren Kette Igκ, oder es folgt eine mono- oder sogar biallelische Deletion von IGK-Genen und es kommt zur Expression von Igλ anstelle von Igκ. Dem zufolge verfügen alle Igλ-positiven B-Zellen, so auch entsprechende Lymphome, über mono- oder biallelische IGK-Deletionen³, sodass in diesen Lymphozyten gegebenenfalls kein IGK-Rearrangement mehr nachweisbar wäre und somit kein Erkenntnisgewinn durch die Klonalitätsanalyse nach

IGK-PCR zu erwarten wäre. Es wurde daher entschieden, die IGK-Analyse nur anzuschließen, wenn die IGH-Analyse keine sichere Diagnose zulässt.

Bei Verdacht auf T-Zell-Neoplasie entschieden wir uns an erster Stelle für die TCRG-PCR. Das Rearrangement der TCRG-Gene findet früh in der Entwicklung der T-Zellen statt⁵⁴ und zahlreiche maligne Erkrankungen der T-Zellen weisen ein TCRG-Rearrangement auf. So finden sie sich beispielsweise in über 90% der akuten lymphatischen Leukämien der T-Zellen (T-ALL) und in 50-75% der peripheren T-NHL. Zudem werden auch in TCRαβ-Lymphozyten die TCRG-Gene nicht deletiert und kommen somit sowohl in TCRαβ-Zellen, als auch in TCRγδ-Zellen vor^{3,30,55}. Aus diesen Gründen wurde zunächst die TCRG-PCR durchgeführt und die TCRB-PCR angeschlossen, wenn nach TCRG-Analyse keine sichere Diagnosestellung möglich war.

Insgesamt konnte in der Gruppe der folliculären Lymphome nach alleiniger IGH-PCR in 21 von 28 Fällen bereits eine Monoklonalität gezeigt werden. Sieben Fälle wurden einer zusätzlichen Analyse der IGK-Targets unterzogen. Hierbei handelte es sich zum einen um drei Fälle mit polyklonalem Ergebnis der vorausgegangenen IGH-PCR. Hier sollte die angeschlossene IGK-PCR eine mögliche, zuvor nicht erkannte Monoklonalität aufdecken. Zum anderen hatten vier Fälle nach Analyse der IGH-Targets eine nicht zweifelsfrei identifizierbare Monoklonalität vor polyklonalem Hintergrund gezeigt. In diesen Fällen wurde die IGK-PCR angeschlossen, um im Falle eines ebenfalls monoklonalen Ergebnisses die diagnostische Sicherheit zu erhöhen.

Bei drei polyklonalen Fällen nach alleiniger IGH-PCR konnte in einem Fall eine Monoklonalität der IGK-Targets aufgedeckt werden und somit einen Zusatznutzen erbringen.

Bei den anderen beiden Fällen blieb es bei einem polyklonalen Ergebnis, sodass trotz klinischen Verdachts weiterhin keine Monoklonalität nachweisbar war.

Alle vier Fälle uneindeutiger Monoklonalität vor polyklonalem Hintergrund zeigten eine zusätzliche Monoklonalität der IGK-Targets, sodass hiermit die diagnostische Sicherheit erhöht werden konnte.

In der Gruppe der DLBCL zeigte sich in 10 von 15 Fällen nach alleiniger IGH-PCR bereits eine Monoklonalität. Vier Fälle wiesen auf eine Polyklonalität hin, bei einem Fall handelte es sich um eine fragliche Monoklonalität vor polyklonalem Hintergrund. Die IGK-PCR

deckte in zwei der vier polyklonalen Fälle eine zuvor unerkannte Monoklonalität auf. Der eine Fall der uneindeutigen Monoklonalität zeigte auch nach IGK-PCR keine eindeutige Monoklonalität.

Neun der zwölf untersuchten T-Zell-Populationen zeigten nach alleiniger TCRG-PCR bereits ein monoklonales Ergebnis, drei wiesen auf eine Polyklonalität hin. Hier stand in zwei Fällen nicht mehr genügend DNA-Material für eine weitere Analyse zur Verfügung, sodass keine TCRB-Analyse angeschlossen werden konnte. Der verbleibende Fall zeigte nach der zusätzlich durchgeführten TCRB-PCR weiterhin ein polyklonales Ergebnis.

Sowohl im Falle der B-Zellen, als auch der T-Zellen, ließ sich nach alleiniger Analyse von IGH bzw. TCRG im Rahmen unserer Testgruppe oftmals bereits eine klare Aussage bezüglich der Klonalität treffen.

Die zusätzliche Analyse von IGK oder TCRB kann einen Monoklonalitätsverdacht bei vorausgegangener Analyse von IGH und TCRG den Verdacht nur dann erhärten, wenn diese ein monoklonales Rearrangement aufweisen. Findet sich kein weiteres klastisches Rearrangement eines anderen Gens in den IGK oder TCRB-Bereichen, so wird die Analyse der zusätzlichen Targets auch keine weiteren Hinweise auf eine mögliche Klonalität geben können. Van Dongen *et al.* berichten daher, dass sich bei nicht eindeutig diagnostizierbarer Monoklonalität nach der Kapillarelektrophorese der zunächst durchgeführten IGH bzw. TCRG PCR, beispielsweise im Sinne einer nicht sicheren Monoklonalität vor polyklonalem Hintergrund, die Wiederholung der PCR mit den zuerst eingesetzten Primern IGH oder TCRG von größerem Nutzen ist als die Zusatzdiagnostik an weiteren Targets. Tritt der suspekte Peak in der Fragmentlägenanalyse in gleicher Form erneut auf, lässt sich dies als Erhärtung des Verdachts auf Klonalität deuten⁵³. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für jedes Assay standardmäßig je ein Ansatz mit 25ng Probe-DNA und ein Ansatz mit 50ng der PCR zugeführt. Somit wurde für jede Analyse bereits ein Duplikat erstellt. Die Wiederholung fand daher standardmäßig statt. Hierdurch konnten suspekte Peaks der Duplikate direkt miteinander verglichen und auf Plausibilität geprüft werden.

Interessanterweise konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nach Erweiterung der PCR um die IGK bzw. TCRB – Targets in vier von fünf Fällen uneindeutiger Monoklonalität vor polyklonalem Hintergrund nach IGH – PCR auch überraschend häufig eine zusätzliche Klonalität der IGK bzw. TCRB-Targets gefunden werden und die zusätzliche Analyse

somit einen Zusatznutzen bieten. Daher wird in der Routinediagnostik nicht nur im Falle einer Polyklonalität, sondern auch im Falle einer nicht sicher identifizierbaren Monoklonalität, die zusätzliche Analyse der IGK bzw. TCRB-Targets angeschlossen.

Wie gezeigt ermöglichte die PCR zunächst nur mit den von uns als Erstlinienassays festgelegten IGH bzw. TCRG-Primern in 40 von 55 Fällen bereits eine verlässliche Analyse. Nach zunächst polyklonalem Ergebnis der Analyse mittels IGH bzw. TCRG-Primer fand sich eine zuvor nicht aufgedeckte Monoklonalität nach Analyse mittels IGK bzw. TCRB-Primer in drei von acht untersuchten Fällen. Daher halten wir es für die Routinediagnostik vertretbar und deutlich kosteneffektiver, die PCR anfänglich auf IGH bzw. TCRG zu beschränken. Dennoch sollte die Möglichkeit einer Nachbestimmung des Mutationsstatus der anderen Targets immer in Betracht gezogen werden, wenn die erste Klonalitätsanalyse ein polyklonales Ergebnis trotz klinisch weiterhin bestehenden hochgradigen Verdachts auf ein Lymphom anzeigt. Sollte auch nach PCR der IGK oder TCRB-Targets weiterhin keine Monoklonalität zu finden sein, stehen zusätzlich zu den in dieser Arbeit verwendeten IGH V-J Primern weitere IGH D-J, sowie IGL- und TCRD-Primer zur Verfügung. Klonale Mutationen dieser Loci

treten jedoch deutlich seltener auf⁴⁷, sodass wir im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Verwendung verzichteten.

Der von van Dongen *et al.* vorgeschlagene diagnostische Algorithmus wurde somit modifiziert und wie in Abbildung 26 verdeutlicht abgeändert.

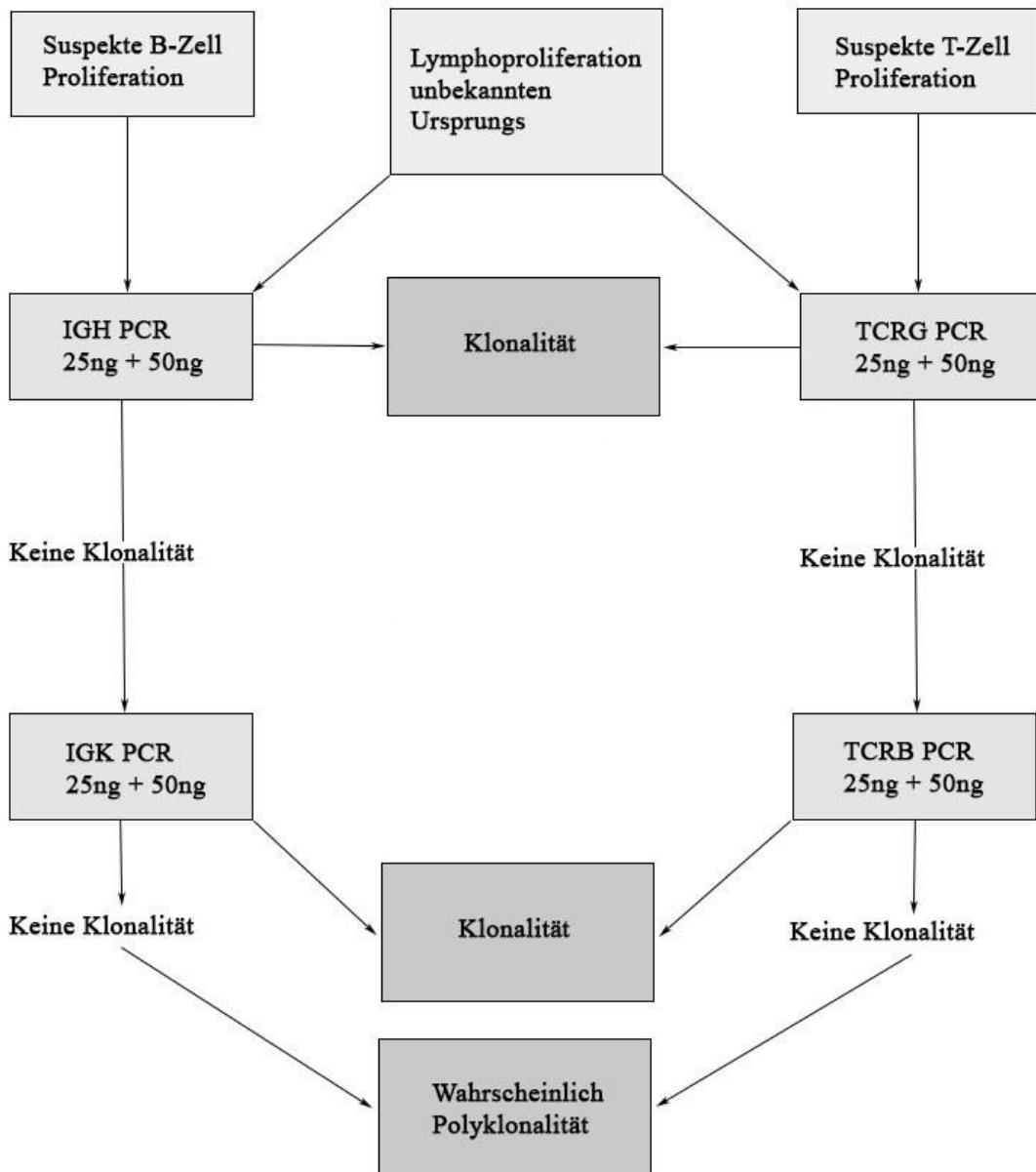


Abbildung 25: Modifizierter diagnostischer Algorithmus für die Klonalitätsanalyse suspekter Lymphoproliferationen. Bei Verdacht auf B-Zell-Proliferationen führt zuerst eine IGH-PCR durch. Die PCR wurde stets als Duplikat mit 25ng und 50ng DNA-Probe durchgeführt. Zeigte sich in der IGH-PCR keine Monoklonalität, so wurde die IGK-PCR zur Fragmentlängenanalyse weiterer Targets angeschlossen. Auch diese PCR fand als Duplikat statt. Ließ sich hier ebenfalls keine Klonalität aufdecken, so war von einer Polyclonalität auszugehen.

Analog zu diesem Algorithmus gestaltete sich die Überprüfung suspekter T-Zell Proliferationen mit den TCRG- und TCRB-Primern; modifiziert nach van Dongen et al. 2007.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigten eine deutliche Überlegenheit der Biomed-2-Primer gegenüber den Standardprimern in den vorselektierten Fällen. So erreichte die hausinterne Standardmethode im direkten Vergleich mit den Biomed-2-Primern lediglich eine Sensitivität von 62% in der Analyse folliculärer Lymphome, 46% im Einsatz bei DLBCL und nur noch 22% im Falle eines T-Zell-Lymphoms. Dennoch verfügte die hausinterne Methode in allen Testgruppen über eine hohe Spezifität und erreichte in der Gruppe der FL 100%, in der Gruppe der DLBCL 50% und in der Gruppe der T-Zell-Lymphome wiederum 100%. Es ist jedoch zu beachten, dass die ausgesuchten Fälle nicht vollständig repräsentativ für die tägliche Routinediagnostik sind, sondern wie eingangs erwähnt auch eine große Anzahl von Fällen beinhalteten, bei denen bereits bekannt war, dass eine Klonalität trotz hochgradigen klinischen Verdachts mit den Standardprimern nicht oder nicht eindeutig detektierbar war. Es sollte für genau diese Problemfälle überprüft werden, ob der Einsatz der Biomed-2-Primer zu einer höheren diagnostischen Sicherheit führen könnte.

In diesen Fällen konnte die Biomed-2-PCR oftmals klonale Veränderungen aufzeigen, die mit der Standardmethode zuvor nicht detektierbar waren. So entsteht eine ungewöhnlich niedrige Sensitivität bei einer ungewöhnlich hohen Spezifität der Standardmethode mit nur wenigen falsch-positiven Ergebnissen und einer beträchtlichen Anzahl falsch-negativer Ergebnisse. Bei einer deutlich größeren Gruppe mit vollständig randomisierten Fällen, die nicht bereits aus der vorausgegangenen Routinediagnostik mit den hausinternen Primern als kritische Fälle bekannt waren, wäre die Statistik möglicherweise weniger drastisch ausgefallen. Es ist zu vermuten, dass eine solche größere Gruppe eine höhere Anzahl an Fällen beinhaltet hätte, deren Klonalität mit den hausinternen Assays problemlos nachweisbar gewesen wären. Hierfür wäre eine weitere, größer angelegte Probeanalyse zur Erweiterung des Kollektivs sinnvoll.

Diese Arbeit verfolgte ebenfalls das Ziel, die Anwendungsfreundlichkeit und Wirtschaftlichkeit im Sinne der möglichen Einführung in die Routinediagnostik zu optimieren. Die Standardmethode erforderte stets eine zusätzliche Verdünnung der PCR-Produkte vor dem Auftragen auf den Kapillarsequenzierer. Dies erwies sich

allerdings im Hinblick auf zeitsparendes und wirtschaftliches Arbeiten in der Routinediagnostik einer großen Universitätsklinik aufgrund der hohen Menge anfallender Proben als wenig praktikabel. Wir haben aus diesem Grund im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die in der Biomed-2-PCR erzeugten Produkte auch unverdünnt in die Kapillarelektrophorese einsetzbar sind. Wir konnten hierbei bestätigen, dass die Verdünnung der PCR-Produkte nicht erforderlich ist und auch unverdünnt eine zuverlässige Fragmentlängenanalyse möglich ist. Dies bedeutet im Vergleich mit den hausinternen Primern eine effektive Zeitersparnis und Minimierung von Fehlerquellen, die durch den andernfalls notwendigen zusätzlichen Pipettivorgang entstehen.

Ein weiterer Vorteil der Biomed – Methode ist, dass nur eine PCR pro Locus erforderlich ist. Bei der Verwendung der Standardprimer war stets eine nested PCR erforderlich, so dass für jede Klonalitätsanalyse zwei aufeinander folgende PCRs vorbereitet und durchgeführt werden mussten. Dies erfordert nicht nur mehr Zeit und zusätzlichen Personaleinsatz, sondern beherbergt durch die zusätzlichen Arbeitsschritte wiederum weitere Fehlerquellen.

Ein zusätzlicher Vorteil der Biomed-2-Primer ist die Möglichkeit der Konsultation der EuroClonality Gruppe, falls bei der Interpretation der Fragmentlängenanalyse von Lymphomverdachtsfällen Fragen auftreten. Hier besteht das Angebot, den Fall einzureichen und durch EuroClonality überprüfen zu lassen. In der Regel ist innerhalb von zwei Wochen eine Einschätzung des Falles durch die EuroClonality Gruppe zu erhalten⁵⁶.

Ein Nachteil der Biomed-2-Primer ist die Lagerung. Während die Primer der Standardmethode in den Gefrierschränken direkt im Labor bei -20° C gelagert werden können, erfordern die Biomed-2-Kits eine Lagerung bei -80° C und somit gesonderte Hochleistungsgefrierschränke.

Der vermutlich größte Nachteil der Biomed-2-Methode ist der Kostenpunkt. So kostet zum Zeitpunkt der Verfassung dieser Arbeit ein Assay zur Detektion klonaler IGH Rearrangements 1060€. Dieses ist für 33 Reaktionen vorgesehen. Somit belaufen sich die Kosten pro durchgeführter PCR auf 32,12€. Das IGK-Assay kostet 717€, das TCRG-Assay 899€ und das TCRB-Assay 1230€. Somit belaufen sich die Kosten pro PCR für IGK auf 21,73€, für TCRG auf 27,24 und für TCRB auf 37,27€.

Diese Kosten richten sich jedoch nach den vorgeschlagenen Arbeitsanweisungen des Herstellers Invivoscribe^{57–60}. Diese Protokolle haben wir wie beschrieben abgeändert. So wurde im Vorfeld die Reduktion der erforderlichen Menge des eingesetzten Primer Master Mix von 45µl auf 5µl etabliert und validiert. Dadurch lassen sich die möglichen Reaktionen pro bestelltem Assay von 33 auf 300 zu steigern. Es reduzieren sich folgerichtig die Kosten für die Primer pro durchgeföhrter PCR annähernd um den Faktor 10. Somit liegen die Kosten für eine IGH-PCR bei 3,53€, für eine IGK-PCR bei 2,39€, für eine TCRG-PCR bei 3,00€ und für eine TCRB-PCR bei 4,10€. Die hierdurch entstandene Ersparnis ist beträchtlich.

Die Verwendung der Standardprimer ist dennoch weitaus günstiger. Die Kosten pro bestelltem Assay liegen hier bei etwa 25€. Pro Assay sind ca. 250 Reaktionen möglich. Die Kosten pro durchgeföhrter PCR mittels dieser Methode belaufen sich also auf ca. 0,10€. Gerade bei einer hohen Anzahl durchgeföhrter PCRs ist der wirtschaftliche Vorteil dieser Methode enorm.

In einem großen Institut wie der Pathologie des Universitätsklinikums Köln ist die Wirtschaftlichkeit ein nicht zu unterschätzender Faktor. Es ist davon auszugehen, dass gerade kleinere Labore allein schon aus Kostengründen davon absehen könnten, die Biomed-2-Primer in ihrer Routinediagnostik zu etablieren, obwohl diese gegebenenfalls zu einer Erhöhung der diagnostischen Qualität beitragen könnten. Im Hinblick auf die stets bestmögliche Versorgung der Patienten wäre es daher wünschenswert, wenn die Kosten des Einsatzes der Biomed-2-Primer entweder reduziert werden könnten oder aber die komplette Leistung durch die Krankenkassen abgedeckt wäre.

Nachfolgend sind in Abbildung 27 die herausgearbeiteten Vor- und Nachteile beider Methoden tabellarisch aufgeführt.

Biomed-2

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">+ Höhere Sensitivität in bekannten Problemfällen+ Verdünnung von PCR - Produkten nicht erforderlich+ Nur ein PCR - Durchgang erforderlich+ Angebot der Expertenkonsultation durch EuroClonality | <ul style="list-style-type: none">- Teuer- Lagerung bei -80°C notwendig |
|--|--|

Standardprimer

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">+ Hohe Spezifität+ Langjährige Erfahrung in der Anwendung+ Günstig+ Lagerung bei -20°C möglich | <ul style="list-style-type: none">- Geringere Sensitivität in bekannten Problemfällen- Verdünnung von PCR - Produkten erforderlich- Nested PCR erforderlich |
|---|---|

Abbildung 26: Vor- und Nachteile der verglichenen Methoden tabellarisch aufgelistet

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz der Biomed-2-PCR deutlich mehr Fälle von Monoklonalität aufdeckt als die Standardmethode und somit zu einer beträchtlichen Steigerung der diagnostischen Sicherheit bei der Fragmentlängenanalyse beitragen kann. So konnte die Standardmethode im Vergleich mit Biomed-2 bei den folliculären Lymphomen lediglich eine Sensitivität von 62% erreichen. Bei den DLBCL kam die Standardmethode im Vergleich zu Biomed-2 auf eine Sensitivität von 42%. Noch verheerender fiel das Ergebnis in der Gruppe der T-Zellen aus, in der die Standardmethode im Vergleich zu Biomed-2 nur noch eine Sensitivität von 22% erreichte. Zwar fallen die ermittelten Sensitivitäten der Standardmethode aufgrund der Fallzusammenstellung niedriger aus, als unter Realbedingungen vermutlich zu erwarten wäre. Jedoch war es das Ziel dieser Arbeit, die beiden Methoden im Einsatz mit genau diesen problematischen Fällen zu vergleichen und so zu untersuchen, ob sich die Biomed-2 PCR in den Problemsituationen als überlegen erweist, oder aber ob die bislang verwendete PCR-Methode eine günstige und vergleichbar gute Alternative darstellen kann. Als Klinik der Maximalversorgung und Zentrum der Wissenschaft ist es das Anliegen des Universitätsklinikums Köln, jedem Patienten die bestmögliche Versorgung bieten zu können. Die Standardprimer haben sich im langjährigen Einsatz

zwar als weitgehend zuverlässig und kostengünstig erwiesen, jedoch ist die Überlegenheit der Biomed-2-Primer in vorselektiert uneindeutigen Fällen nicht von der Hand zu weisen. Daher wurde im Sinne des Patientenwohls entschieden, auch im Rahmen der Routinediagnostik fortan die Biomed-2 Primer zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan L. Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol* 1993; **169**: 291–5.
- 2 Lorenzen J, Wintzer C, Zhao-Höhn M, et al. Single-cell Analysis of T-cell Receptor-[gamma] Rearrangements in Large-cell Anaplastic Lymphoma. *Diagnostic Mol Pathol* 1996; **5**.
https://journals.lww.com/molecularpathology/Fulltext/1996/03000/Single_cell_Analysis_of_T_cell_Receptor_gamma_.3.aspx (Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)
- 3 van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; **17**: 2257–317.
- 4 Hodgkin T. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* 1832; **17**: 68–114.
- 5 Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. *IARC Nonserial Publ WHO Press* 2014; : 422–31.
- 6 Lakhtakia R, Burney I. A Historical Tale of Two Lymphomas: Part I: Hodgkin lymphoma. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2015; **15**: e202-6.
- 7 Reed DM. On the pathological changes of Hodgkin's disease with especial reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep* 1902; **10**: 133–96.
- 8 STERNBERG, C. Ueber eine eigenartige unter dem Bilde der pseudoleukemic verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparatus. *Ztschr f Heilk* 1898; **19**: 21–90.
- 9 Robert-Koch-Institut; GEKID. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 2017.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland

nd/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf;jsessionid=8E4F6ABA001AB21A5F175896152C57DD.2_cid298?__blob=publicationFile (Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)

- 10 Abramson JS. Non-Hodgkin Lymphoma. In: Abruzzese JL, Abdel-Wahab O, Abou-Alfa GK, et al., eds. Abeloff's Clinical Oncology, 6th edn. Philadelphia, Pa: Elsevier, 2020: 1926–48.
- 11 Clarke CA, Glaser SL. Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. *Cancer* 2002; **94**: 2015–23.
- 12 Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Incidence and mortality from non-Hodgkin lymphoma in Europe: The end of an epidemic? *Int J Cancer* 2008; **123**: 1917–23.
- 13 Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2017; **390**: 298–310.
- 14 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**: 503–11.
- 15 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**: 2375–90.
- 16 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *World Heal Organ Calssification Tumours Haematop Lymphoid Tissue* 2008; **4th**: 326.
- 17 Arber DA. Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *J. Mol. Diagnostics*. 2000; **2**: 178–90.
- 18 Jeffrey Medeiros L, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; **123**: 1189–207.
- 19 Nossal GJ V. The Basic Components of the Immune System. *N Engl J Med* 1987; **316**: 1320–5.
- 20 Cooper MD. B Lymphocytes. *N Engl J Med* 1987; **317**: 1452–6.
- 21 Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science (80-)* 1987; **238**: 1073 LP – 1079.

- 22 Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; **8**: 3–26.
- 23 van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin. Chim. Acta*. 1991; **198**: 1–92.
- 24 Schroeder Jr HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: S41–52.
- 25 Allison JP, Lanier LL. Structure, Function, and Serology of the T-Cell Antigen Receptor Complex. *Annu Rev Immunol* 1987; **5**: 503–40.
- 26 Meuer SC, Acuto O, Hercend T, Schlossman SF, Reinherz EL. The Human T-Cell Receptor. *Annu Rev Immunol* 1984; **2**: 23–50.
- 27 Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, et al. Identification of a Putative Second T-cell Receptor. *Nature* 1986; **322**: 145–9.
- 28 Brenner MB, McLean J, Scheft H, et al. Two forms of the T-cell receptor γ protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1987; **325**: 689–94.
- 29 Borst J, van de Griend RJ, van Oostveen JW, et al. A T-cell receptor γ /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 1987; **325**: 683–8.
- 30 Van Dongen JJM ba., Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta* 1991; **198**: 93–174.
- 31 Leder P. The Genetics of Antibody Diversity. *Sci Am* 1982; **246**: 102–15.
- 32 Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575–81.
- 33 Yoshikai Y, Clark SP, Taylor S, et al. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor α -chain. *Nature* 1985; **316**: 837–40.

- 34 Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW. Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 8624–8.
- 35 Griesser H, Champagne E, Tkachuk D, *et al*. The human t cell receptor α-δ locus: a physical map of the variable, joining and constant region genes. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 641–4.
- 36 Satyanarayana K, Hata S, Devlin P, *et al*. Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 8166–70.
- 37 Burrows PD, Cooper MD. B cell development and differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; **9**: 239–44.
- 38 van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, *et al*. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: - Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 201–6.
- 39 Miller JE, Wilson SS, Jaye DL, Kronenberg M. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay. *Mol Diagn* 1999; **4**: 101–17.
- 40 Langerak AW, Groenen PJTA, JM van Krieken JH, van Dongen JJM. Immunoglobulin/T-cell receptor clonality diagnostics. *Expert Opin Med Diagn* 2007; **1**: 451–61.
- 41 Moreau EJ, Langerak AW, van Gastel-Mol EJ, *et al*. Easy detection of all T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1999; **13**: 1620–6.
- 42 Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis. *Leukemia* 1999; **13**: 965–74.
- 43 Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, Lam KH, van Dongen JJM, Langerak AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagn* 2005; **7**: 495–503.

- 44 Liu H, Bench AJ, Bacon CM, *et al.* A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *Br J Haematol* 2007; **138**: 31–43.
- 45 Brüggemann M, White H, Gaulard P, *et al.* Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 215–21.
- 46 Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, *et al.* Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: Usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; **21**: 222–9.
- 47 Evans PAS, Pott C, Groenen PJTA, *et al.* Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2006; **21**: 207.
- 48 Schild T. Die PCR als Grundlage in der molekularen DNA-Analyse. Autom. Genet. Anal. 2009; : 19–44.
- 49 GM S, L M, A F, F C, M G. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1345–9.
- 50 Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, *et al.* Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; **116**: 2040–5.
- 51 Kokovic I, Novakovic BJ, Cerkovnik P, Novakovic S. Clonality analysis of lymphoid proliferations using the BIOMED-2 clonality assays: a single institution experience. *Radiol Oncol* 2014; **48**: 155–62.
- 52 Küppers R, Klein U, Hansmann M-L, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 1999; **341**: 1520–9.
- 53 Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, *et al.* EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012; **26**: 2159–71.

- 54 Blom B, Verschuren MCM, Heemskerk MHM, *et al.* TCR Gene Rearrangements and Expression of the Pre-T Cell Receptor Complex During Human T-Cell Differentiation. *Blood* 1999; **93**: 3033 LP – 3043.
- 55 Szczepański T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, *et al.* Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; **13**: 196–205.
- 56 EuroClonality Support. <https://euroclonality.org/support/diagnostic-support> (Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)
- 57 IdentiClone TCRG Clonality Assay. Instructions for Use.
<https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280076.pdf>
(Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)
- 58 IdentiClone IGK Gene Clonality Assay. Instructions for Use.
<https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280016.pdf>
(Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)
- 59 IdentiClone IGH Gene Clonality Assay. Instructions for Use.
<https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280255.pdf>
(Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)
- 60 IdentiClone TCRB Gene Clonality Assay. Instructions for Use.
<https://invivoscribe.com/uploads/products/instructionsForUse/280046.pdf>
(Zuletzt abgerufen am 07.01.2024)

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014. Herausgegeben durch GEKID e.V. (Krebs in Deutschland für 2013/2014, S. 16)	10
Abbildung 2: Verteilung der geschätzten Neuerkrankungsrate und Mortalität für Lymphomerkrankungen; nach Steward et al. 2014	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines membrangebundenen Immunglobulins auf einem B-Lymphozyten	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines T-Zell-Rezeptors. $\text{V}\alpha$: variabler Anteil von TCR- α ; $\text{V}\beta$: variabler Anteil von TCR- β . Der CD3-Komplex mit seinen Untereinheiten δ , ϵ , γ und ζ ist an der Signalweiterleitung ins Zellinnere beteiligt.....	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung humaner IG-Gene der B-Lymphozyten.....	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung humaner TCR-Gene	17
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der V-D-J-Rekombination eines TCR- β -Gens, welches für die β -Kette eines TCR kodiert; modifiziert nach van Dongen et al. 2003 ..	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR; Modifiziert nach Schild, 1997	22
Abbildung 9: Schematische Darstellung einer nested – PCR	24
Abbildung 10: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung von FFPE-Material.....	29
Abbildung 11: Verwendung des markierten Areals vom Objektträger des nun entparaffinierten Materials zur weitergehenden DNA-Extraktion.	30
Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung einer Gelelektrophorese mit genomicscher DNA	32
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer auf einem IGH – Gen und Primersequenzen der FR – Primer in ihren jeweiligen Ansätzen (= tubes A-C), sowie Sequenz des Rückwärtsprimers der JH-Region; nach van Dongen et al. 2003	33
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer der IGK – Gene in den Ansätzen A und B, sowie ihre Primersequenzen; nach van Dongen et al. 2003	34
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Primersequenzen und Bindungsstellen an den TCRG – Genen; nach van Dongen et al. 2003.....	35
Abbildung 16: Schematische Darstellung der TCRB – Primer mit ihren Sequenzen und Bindungsstellen am TCRB – Lokus in ihren jeweiligen Tubes; nach van Dongen et al. 2003.	36
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung des Peakmusters bei der Fragmentlängenanalyse nach Kapillarelektrophorese; modifiziert nach van Dongen et al. 2003.....	43

Abbildung 18: Oben: Fragmentlängen Fall BF16, IGH FR1: Die Fragmentlängenverteilung spricht für eine Polyklonalität. Unten: Fragmentlängen Fall BF16, IGK B: In der angeschlossenen IGK – PCR zeigt sich ein deutlicher Peak, welcher mit einer Monoklonalität vereinbar ist.....	47
Abbildung 19: Oben: Fragmentlängen Fall BF12, IGH FR1: Die Fragmentlängenanalyse spricht für eine Polyklonalität. Unten: Fragmentlängen Fall BF12 IGK A: Der Peak bei 149Nt ist nach IGK A – PCR regelhaft anzufinden und nicht wegweisend für eine Monoklonalität. Die restlichen Fragmentlängen lassen ebenfalls keine Diagnosestellung einer Monoklonalität zu.....	47
Abbildung 20: Klonalitätsanalysen der Follikulären Lymphome in Vierfeldertafel	50
Abbildung 21: Oben: Fragmentlängen Fall BD16, IGH FR1: Es zeigen sich wenige, unspezifische Produkte. Unten: Fragmentlängen Fall BD16, IGK B: Die beiden dominanten Peaks bei 274Nt und 282Nt sind ein typischer Hinweis auf Monoklonalität in der Fragmentlängenanalyse der IGK B – PCR.....	53
Abbildung 22: Oben: Fragmentlängen Fall BD3, IGH FR1: Nicht auswertbar bei Fluoreszenzintensitäten unter 330 RFU. Unten: Fragmentlängen Fall BD3, IGK B: Es zeigt sich kein dominanter Peak, der Verdacht auf Monoklonalität kann molekularpathologisch nicht bestätigt werden.....	53
Abbildung 23: Klonalitätsanalysen der DLBCL in Vierfeldertafel	55
Abbildung 24: Oben: Fragmentlängen Fall T6, TCRG A: Peakmuster vereinbar mit Polyclonalität. Unten: Fragmentlängen Fall T6, TCRB A: Auch in der angeschlossenen TCRB – PCR lässt sich keine Monoklonalität aufdecken.	59
Abbildung 25: Diagnostischer Algorithmus zur Klonalitätsanalyse suspekter Lymphoproliferationen; nach van Dongen et al. 2007.	65
Abbildung 26: Modifizierter diagnostischer Algorithmus für die Klonalitätsanalyse suspekter Lymphoproliferationen; modifiziert nach van Dongen et al. 2007.	70
Abbildung 27: Vor- und Nachteile der verglichenen Methoden tabellarisch aufgelistet..	
.....	74

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Hersteller	26
Tabelle 2: Reagenzien und Hersteller	27
Tabelle 3: Cyclerbedingungen der B-Zell Standardprimer 2A. Es erfolgte eine nested – PCR, bei der die erste PCR wie in der Tabelle beschrieben 30 Zyklen umfasste. Die zweite PCR fand mit 50 Zyklen unter denselben Bedingungen statt.	39
Tabelle 4: Cyclerbedingungen der B-Zell Standardprimer 3A. Die beiden Durchläufe der nested – PCR fanden mit jeweils 30 Zyklen statt.	39
Tabelle 5: Cyclerbedingungen der T-Zell Standardprimer. Die beiden Durchläufe der nested – PCR fanden mit jeweils 40 Zyklen statt.	40
Tabelle 6: Cyclerbedingungen der Biomed B-Zell – Primer.	40
Tabelle 7: Cyclerbedingungen der Biomed T-Zell – Primer.	40
Tabelle 8: Ergebnisse der Positivkontrollen der B-Zellen mittels Biomed-2 – PCR.....	44
Tabelle 9: Ergebnisse der Negativkontrollen der B-Zellen mittels Biomed-2 – PCR	45
Tabelle 10: Gruppe 1 der follikulären Lymphome im Vergleich der Klonalitätsanalysen mittels Standardprimer und Biomed-2.....	48

Tabelle 11: Gruppe 2 der follikulären Lymphome im Vergleich der Klonalitätsanalysen mittels Standardprimer und Biomed-2.....	49
Tabelle 12: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der Follikulären Lymphome ...	51
Tabelle 13: Vergleich der Klonalitätsanalysen der DLBCL mittels Standardprimer und Biomed-2	54
Tabelle 14: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der DLBCL	56
Tabelle 15: Ergebnisse der Positivkontrollen der T-Zellen mittels Biomed-2 – PCR....	57
Tabelle 16: Ergebnisse der Negativkontrollen der T-Zellen mittels Biomed-2 – PCR ..	58
Tabelle 17: Vergleich der Klonalitätsanalysen der T-Zellen mittels Standardprimer und Biomed-2	60
Tabelle 18: Klonalitätsanalysen der T – Zell – Lymphome in Vierfeldertafel.....	61
Tabelle 19: Legende zu der Vierfeldertafel der Gruppe der T-Zell – Lymphome	62