
**VERGLEICH DER POLYMERASE KETTENREAKTION UND DER SOUTHERN
BLOT ANALYSE BEIM NACHWEIS DER BCL-2 TRANSLOKATION BEI
PATIENTEN MIT CENTROBLASTISCH-CENTROCYTISCHEN UND
CENTROBLASTISCHEN NON-HODGKIN LYMPHOMEN**

Arcan Demircioglu

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

**VERGLEICH DER POLYMERASE KETTENREAKTION UND DER SOUTHERN
BLOT ANALYSE BEIM NACHWEIS DER BCL-2 TRANSLOKATION BEI
PATIENTEN MIT CENTROBLASTISCH-CENTROCYTISCHEN UND
CENTROBLASTISCHEN NON-HODGKIN LYMPHOMEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arcan Demircioglu

aus
Terme (Türkei)

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bertold Emmerich

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Dreyling

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. Katharina Pachmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2004

Meinen lieben Eltern
in tiefer Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| TABELLENVERZEICHNIS | 7 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 8 |
| LISTE DER ABKÜRZUNGEN UND ERLÄUTERUNGEN | 9 |
| 1 EINLEITUNG | 12 |
| 1.1 Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome | 12 |
| 1.2 Pathogenese und klinische Eigenschaften der folliculären Keimzentrumslymphome | 15 |
| 1.3 Apoptose und das bcl-2 Protein | 15 |
| 1.4 Genetische Eigenschaften der folliculären Keimzentrumslymphome: Die Translokation t(14;18) (q32;q21) und das Proto-Onkogen bcl-2 | 16 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit | 18 |
| 1.5.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation | 18 |
| 1.5.2 Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA im Vergleich mit Histologie, Cytologie und Immuncytologie des Knochenmarks / des Blutes | 20 |
| 1.5.3 PCR und Southern Blot Analyse als Methode zur Verlaufsbeobachtung | 21 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 22 |
| 2.1 Patienten | 22 |
| 2.1.1 Studienpopulation | 22 |
| 2.1.2 Materialgewinnung | 22 |
| 2.1.3 Hauptdaten der Patienten | 23 |
| 2.1.4 Klinisches Stadium bei Materialentnahme | 23 |
| 2.1.5 Durchgeführte Therapie vor und nach Materialentnahme | 24 |
| 2.1.6 Einteilung des Allgemeinzustandes nach WHO | 25 |
| 2.2 Evaluierung der Sensitivität und Spezifität durch Kontrollen | 27 |
| 2.2.1 Positive Kontrolle | 27 |
| 2.2.2 Negative Kontrolle | 27 |
| 2.3 Morphologische Untersuchung des Knochenmarks | 27 |
| 2.4 Immuncytologische Untersuchung | 27 |
| 2.5 Molekulargenetische Untersuchung | 30 |
| 2.5.1 DNS-Präparation | 30 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5.2 | Photometrische Quantifizierung der DNS..... | 30 |
| 2.5.3 | Southern Blot Analyse genomischer DNS..... | 32 |
| 2.5.3.1 | Spaltung der DNS mittels Restriktionsendonukleasen | 33 |
| 2.5.3.2 | Agarose-Gelelektrophorese der genomischen DNS..... | 34 |
| 2.5.3.3 | Vakuum-Blotten der genomischen DNS | 35 |
| 2.5.3.4 | Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden..... | 36 |
| 2.5.4 | Polymerase Kettenreaktion..... | 38 |
| 2.5.4.1 | PCR-Versuchsbedingungen | 39 |
| 2.5.4.2 | Agarose Gelelektrophorese der PCR Amplifikate | 42 |
| 2.5.4.3 | Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate | 42 |
| 3 | ERGEBNISSE | 44 |
| 3.1 | Ergebnis der Southern Blot Analyse genomischer DNS..... | 44 |
| 3.1.1 | Optimierung der Southern Blot Analyse genomischer DNS..... | 45 |
| 3.1.2 | Ergebnis der negativen und positiven Kontrollreaktionen der SBA..... | 45 |
| 3.1.3 | Ergebnis der SBA bei Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom | 45 |
| 3.1.4 | Ergebnis der SBA bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom . | 46 |
| 3.2 | Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion..... | 47 |
| 3.2.1 | Optimierung der PCR | 47 |
| 3.2.2 | Ergebnis der negativen und positiven PCR-Kontrollreaktionen..... | 51 |
| 3.2.3 | Ergebnis der PCR bei Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom..... | 52 |
| 3.2.4 | Ergebnis der PCR bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom . | 52 |
| 3.3 | Ergebnis der korrelativen Untersuchungen | 56 |
| 3.3.1 | Die Häufigkeit der bcl-2 Translokation | 56 |
| 3.3.2 | Vergleich der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit herkömmlichen diagnostischen Untersuchungen | 57 |
| 3.3.2.1 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+) | 58 |
| 3.3.2.1.1 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+) | 58 |
| 3.3.2.1.2 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-) | 59 |
| 3.3.2.1.3 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+) | 59 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.2.1.4 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-) | 60 |
| 3.3.2.2 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)..... | 60 |
| 3.3.2.2.1 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)..... | 61 |
| 3.3.2.2.2 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)..... | 61 |
| 3.3.2.2.3 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)..... | 62 |
| 3.3.2.2.4 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)..... | 62 |
| 3.3.3 | Vergleich der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit klinischen Verlaufsparemtern..... | 63 |
| 3.3.3.1 | Unterschiede bezüglich des Allgemeinzustands nach WHO | 63 |
| 3.3.3.2 | Unterschiede bezüglich des Überlebens zum Zeitpunkt der Auswertung..... | 63 |
| 3.4 | Molekulargenetische Verlaufsuntersuchung | 64 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE | 66 |
| 5 | DISKUSSION | 68 |
| 5.1 | Diskussion der Methoden..... | 68 |
| 5.1.1 | Kritische Betrachtung der Southern Blot Analyse | 68 |
| 5.1.2 | Kritische Betrachtung der Polymerase Kettenreaktion | 69 |
| 5.1.3 | Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA..... | 73 |
| 5.2 | Diskussion der Ergebnisse..... | 74 |
| 5.2.1 | Häufigkeit der bcl-2 Translokation in der untersuchten Patientengruppe | 74 |
| 5.2.2 | Unterschiede im Krankheitsverlauf der Patienten mit bcl-2 Translokation | 76 |
| 5.2.3 | Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Studien..... | 77 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 78 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 81 |
| | DANKSAGUNG..... | 89 |
| | LEBENS LAUF..... | 90 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Unterschiedliche Klassifikation der B-Zell Lymphome | 14 |
| Tabelle 2: Häufigkeit der Bruchpunkte am Chromosom 18 in folliculären Lymphomen in der Literatur | 19 |
| Tabelle 3: Diagnosen der Patienten..... | 23 |
| Tabelle 4: Geschlechtsverteilung der Patienten | 23 |
| Tabelle 5: Verteilungsform der Non-Hodgkin Lymphome | 23 |
| Tabelle 6: Klinisches Stadium bei Materialentnahme..... | 24 |
| Tabelle 7: Behandlungsschema vor Materialentnahme..... | 24 |
| Tabelle 8: Durchgeführte Therapie nach Materialentnahme..... | 25 |
| Tabelle 9: Allgemeinzustand der Patienten nach WHO-Einteilung..... | 26 |
| Tabelle 10: Häufig verwendete monoklonale Antikörper mit definierter Clusterbezeichnung..... | 29 |
| Tabelle 11: Versuchsansatz der Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden | 37 |
| Tabelle 12: PCR-Amplifikationsschritte | 41 |
| Tabelle 13: Verwendetes Material für die SBA und PCR | 44 |
| Tabelle 14: Ergebnis der Southern Blot Analyse genomischer DNS | 44 |
| Tabelle 15: Ergebnis der SBA bei CB NHL..... | 45 |
| Tabelle 16: Ergebnis der SBA bei CB-CC NHL..... | 46 |
| Tabelle 17: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion | 47 |
| Tabelle 18: PCR-Protokoll der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration mit Placenta-DNS.. | 49 |
| Tabelle 19: PCR-Protokoll der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration mit Placenta-DNS und positiver Probe..... | 50 |
| Tabelle 20: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion bei CB NHL..... | 52 |
| Tabelle 21: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion bei CB-CC NHL..... | 52 |
| Tabelle 22: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR | 56 |
| Tabelle 23: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA..... | 57 |
| Tabelle 24: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR..... | 57 |
| Tabelle 25: Häufigkeit eines histologischen, cytologischen oder immuncytologischen Nachweises eines peripheren Befalls mit Lymphomzellen (KM+ / B+)..... | 58 |
| Tabelle 26: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)..... | 58 |
| Tabelle 27: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)..... | 59 |
| Tabelle 28: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)..... | 59 |
| Tabelle 29: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)..... | 60 |
| Tabelle 30: Häufigkeit eines Nachweises eines Knochenmarksbefalls in der Histologie (KMH+)..... | 60 |
| Tabelle 31: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)..... | 61 |
| Tabelle 32: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)..... | 62 |
| Tabelle 33: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. mit Knochenmarksbefall in der Histologie | 62 |
| Tabelle 34: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. ohne Knochenmarksbefall in der Histologie . | 62 |
| Tabelle 35: Unterschiede bezüglich des Allgemeinzustands nach WHO..... | 63 |
| Tabelle 36: Unterschiede bezüglich des Überlebens zum Zeitpunkt der Auswertung..... | 64 |
| Tabelle 37: Molekulargenetische Verlaufsuntersuchung..... | 64 |
| Tabelle 38: Zusammenfassung der Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA / PCR..... | 66 |
| Tabelle 39: Zusammenfassung der Häufigkeit des Nachweises eines peripheren Befalls durch IC, C, H..... | 67 |
| Tabelle 40: Mehrfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA/PCR | 70 |
| Tabelle 41: Mehrfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA..... | 73 |
| Tabelle 42: Vierfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA..... | 74 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Relation zwischen Zellproliferation und Apoptose..... | 16 |
| Abbildung 2: Chromosomen-Translokation in B-Zell-Lymphomen | 17 |
| Abbildung 3: Mechanismus der Umlagerung am Bruchpunkt der Translokation t(14;18)..... | 17 |
| Abbildung 4: Ansatz der PCR-Amplifikation am Bruchpunkt t(14;18)..... | 21 |
| Abbildung 5: Definition des Allgemeinzustandes von Tumorpatienten nach WHO und Karnofsky..... | 26 |
| Abbildung 6: Protokoll einer Southern Blot Analyse | 33 |
| Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Vakuum-Transfer Systems | 35 |
| Abbildung 8: Ansatz der PCR-Amplifikation an JH und MBR..... | 39 |
| Abbildung 9: PCR-Protokoll..... | 40 |
| Abbildung 10: Die Hot Start PCR-Technik mit AmpliWax PCR Gem 50 Wachskügelchen..... | 41 |
| Abbildung 11: SBA bei Patientenproben OHJ, SM, SK..... | 46 |
| Abbildung 12: Gelelektrophorese der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration mit Placenta-DNS..... | 49 |
| Abbildung 13: Gelelektrophorese der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration mit Placenta-DNS und positiver Probe | 50 |
| Abbildung 14: Agarosegel mit PCR Amplifikaten der Patientenproben SM, OHJ, KL | 53 |
| Abbildung 15: SBA der PCR Amplifikate der Patientenproben SM, OHJ, KL | 53 |
| Abbildung 16: Ethidiumbromid getränktes Agarosegel mit PCR Amplifikaten der Patientenproben PI, BK..... | 55 |
| Abbildung 17: Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate der Patientenproben PI, BK..... | 55 |
| Abbildung 18: Ethidiumbromid getränktes Agarosegel mit PCR Amplifikaten: pos. Kontrolle, Placenta, Patientenprobe SM..... | 72 |
| Abbildung 19: Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate: pos. Kontrolle, Placenta, Patientenprobe SM | 72 |

LISTE DER ABKÜRZUNGEN UND ERLÄUTERUNGEN

| | |
|------------|---|
| Apoptose: | Programmierter Zelltod |
| Bad: | Protein der bcl-2 Familie (Bcl-2 Antagonist of Cell Death) |
| Bak1: | Protein der bcl-2 Familie (Bcl-2 Antagonist Killer 1) |
| Bax: | bcl-2 assoziiertes X-Protein (Bcl-2 Associated X Protein) |
| bcl-2: | B-Zell Lymphom Proto-Onkogen (B Cell Lymphoma 2), in diesen Zellen wurde das Protein erstmals beobachtet |
| Bcl-2A1: | bcl-2 assoziiertes Protein A1 (Bcl-2 Related Protein A1) |
| Bcl-x: | bcl-2 verwandtes Gen (Bcl-2 Related Gene) |
| BH1-BH6: | bcl-2 homologe Domänen 1 bis 6 (Bcl-2 Homology Domain) |
| bp: | Basenpaare |
| C: | Cytologie |
| Caspase: | Apoptose assoziierte Cystein Protease |
| CB NHL: | centroblastisches Non-Hodgkin Lymphom |
| CB-CC NHL: | centroblastisch-centrocytisches Non-Hodgkin Lymphom |
| CEVED: | Chemotherapieschema mit CCNU, Etoposid, Vindesin und Dexamethason |
| CH: | Konstante Gensegmente des Immunglobulin Schwerkettengens |
| CHOP: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison |
| Ci: | Curie |
| COAEP: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Etoposid, Procarbazin und Prednison |
| COHEPP: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Etoposid, Procarbazin und Prednison |
| COP: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison (nach Bagley, 1974) |
| COPBLAM: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Bleomycin, Procarbazin und Prednisolon |

| | |
|-----------------|---|
| COPP: | Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbacin und Prednison |
| CTX: | Chemotherapie |
| DH: | Diversitäts-Gensegment des Immunglobulin Schwerkettengens |
| der: | derivativ |
| DNS: | Desoxyribonukleinsäure |
| dATP: | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP: | Desoxycytosintriphosphat |
| dNTP: | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dTTP: | Desoxythymidintriphosphat |
| dUTP: | Desoxyuridyltriphosphat |
| EDTA: | Ethylendiamintetraacetat |
| g: | Einheit für Erdbeschleunigung, $y \times g =$ das y -fache der Erdbeschleunigung |
| H: | Histologie |
| Hybridisierung: | Bildung eines Nukleinsäure-Doppelstranges aus zwei komplementären Nukleinsäure-Einzelsträngen |
| IC: | Immuncytologie |
| Ig: | Immunglobulin |
| IgH: | Schwerketten-Gensegment der Immunglobuline |
| IMVP: | Chemotherapieschema (Ifosfamid, Methotrexat, VP-16, Uromitexan) |
| JH: | Junktions-Gensegment des Immunglobulin Schwerkettengens |
| kb: | Kilobasen |
| KM: | Knochenmark |
| KNOSPE: | Chemotherapieschema mit Chlorambucil und Prednison nach Knospe |
| MBR: | Bruchpunktregion der Translokation t(14;18) (major breakpoint region) |
| MCR: | Bruchpunktregion der Translokation t(14;18) (minor cluster region) |

| | |
|----------------|--|
| MRD: | minimale Resterkrankung (minimal residual disease) |
| NHL: | Non-Hodgkin Lymphom |
| NOSTE: | Chemotherapieschema mit Prednimustin und Mitoxantron |
| Onkogen: | 1. Aus Tumoviren stammende Gensequenzen, die in normale Zellen eingebaut worden sind; 2. Gensequenzen in Tumoviren, die nach Befall einer Zelle zur Eiweißbiosynthese von Proteinen führen, die ihrerseits eine maligne Transformation bewirken |
| PCR: | Polymerase Kettenreaktion, in vitro Amplifikation von DNS-Sequenzen |
| Proto-Onkogen: | Gensequenzen in normalen Zellen, die Onkogenen weitgehend gleichen und zur malignen Transformation führen können |
| q: | langer Arm eines Chromosoms (analog: p: kurzer Arm) |
| RNA: | Ribonukleinsäure |
| RTX: | Strahlentherapie, Radiotherapie |
| SBA: | Southern Blot Analyse, DNS-Restriktionsfragment Analyse |
| SDS: | Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate) |
| STX: | Stammzelltransplantation |
| t(14;18): | bcl-2 Translokation, Austausch von chromosomalem Material zwischen Chromosom 14 und 18 |
| TAE-Puffer: | Pufferlösung aus Trisbase, Eisessig und EDTA |
| TBE-Puffer: | Pufferlösung aus Trisbase, Borsäure und EDTA |
| Taq: | Bakterium Thermus aquaticus |
| TE: | Tris-EDTA-Puffer |
| Tris: | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan |
| TTP: | Thymidintriphosphat |
| UTP: | Uridintriphosphat |
| V: | Volt |
| VH: | variable Gensegmente des Immunglobulin Schwerekettengens |
| WHO: | Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation) |

1 EINLEITUNG

1.1 Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome

Die malignen Lymphome werden eingeteilt in den M. Hodgkin bzw. die Lymphogranulomatose und die Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome mit einer Häufigkeitsverteilung von etwa 1:3.

Die Non-Hodgkin Lymphome stellen eine heterogene Krankheitsgruppe dar, die hauptsächlich aus B- und T-Zellstadien unterschiedlichen Reifegrades hervorgeht. Wegen dieser Heterogenität bestehen bei Non-Hodgkin Lymphomen z. T. große Unterschiede hinsichtlich des Entstehungsmechanismus, des klinischen Erscheinungsbildes, des Ansprechens auf die Therapie und der Prognose. Das folliculäre Lymphom repräsentiert 25-30% aller malignen Lymphome und zeigt typischerweise einen klinisch indolenten Verlauf (Nickenig et al., 2004).

Die Einteilung erfolgte in Europa hauptsächlich nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation, die auf der Biologie und Cytomorphologie basiert (Lennert et al., 1992) sowie nach der im amerikanischen Sprachraum etablierten „Working Formulation for Clinical Usage“ (Rosenberg et al., 1982), die am klinischen Verlauf orientiert ist. In der „Revised European American Lymphoma“ (REAL)-Klassifikation erfolgt die Einteilung nach der Zugehörigkeit zur B- oder T-Zellreihe und nach der zellulären Ebene der malignen Transformation mit Berücksichtigung des Immunphänotyps und der Genanalyse (Harris et al., 1994).

Innerhalb der letzten Jahre haben substantielle Fortschritte bei den diagnostischen Methoden, insbesondere im Bereich der Immunphänotypisierung, aber auch der Molekularbiologie und Cytogenetik, zu einer wesentlichen Erweiterung des diagnostischen Spektrums geführt. Diese Entwicklungen vermitteln nicht nur neue Einblicke in die Biologie maligner Lymphome, sondern sie sind auch Grundlage für die Identifikation und präzisere Charakterisierung spezifischer Lymphomentitäten mit definierten histopathologischen und klinischen Merkmalen.

Die rasche Erweiterung der Erkenntnisse ist auch die Grundlage für die Weiterentwicklung der Lymphom-Klassifikation, die sich mehr und mehr an biologischen Kriterien orientiert. Die REAL-Klassifikation kann als eine Anpassung an den aktuellen Stand der Erkenntnisse verstanden werden.

Eine weltweit akzeptierte Klassifikation der malignen Lymphome wurde 1997 durch eine von der Weltgesundheitsorganisation WHO initiierte internationale Expertengruppe festgelegt. Dabei wurde auf den Malignitätsgrad als übergeordnetes Einteilungsprinzip verzichtet.

In der vorliegenden Arbeit mit einem Untersuchungszeitraum von Patientenproben von 1992 bis 1994 wurde die Einteilung nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation durchgeführt in niedrigmaligne centroblastisch-centrocytische bzw. hochmaligne centroblastische Non-Hodgkin Lymphome.

Nach der „Working Formulation for Clinical Usage“ werden sie in die folgenden drei Gruppen eingeteilt: niedrigmalignes kleinzelliges Follikelzentrumslymphom, niedrigmalignes gemischtzelliges Follikelzentrumslymphom (klein und großzellig) und intermediärgradig malignes großzelliges Follikelzentrumslymphom.

Dem follikulären oder diffusen centroblastisch-centrocytischen Lymphom nach der aktualisierten Kiel Klassifikation kann das follikuläre Follikelzentrumslymphom Grad I und Grad II oder das diffuse kleinzellige Follikelzentrumslymphom nach der REAL Klassifikation und schließlich die „Follicular lymphoma Variants: Grade 1, 2“ nach der neuen WHO Klassifikation zugeordnet werden.

Dem follikulären oder diffusen centroblastischen Lymphom nach der aktualisierten Kiel Klassifikation kann das follikuläre Keimzentrumslymphom Grad III und das diffuse großzellige B-Zell Lymphom nach der REAL Klassifikation sowie das „Follicular lymphoma Variant Grade 3“ und das diffuse großzellige B-Zell Lymphom nach der neuen WHO Klassifikation zugeordnet werden.

B-Cell Neoplasms

| Updated Kiel Classification 1988 | Revised European American Lymphoma Classification 1994 | New WHO Lymphoma Classification* Preliminary Version (December 1998) |
|---|---|---|
| | Precursor B-Cell Diseases | Precursor B-Cell Diseases |
| B-lymphoblastic | Precursor B-lymphoblastic lymphoma/leukemia | Precursor B-lymphoblastic leukemia**/lymphoma |
| | Peripheral B-Cell Diseases | Peripheral B-Cell Diseases |
| B-Lymphocytic, B-CLL, B-prolymphocytic leukemia | B-cell chronic lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma | B-cell chronic lymphocytic /small lymphocytic lymphoma |
| Lymphoplasmacytoid immunocytoma | B-CLL-Variant: with plasmacytoid differentiation | B-CLL-Variant: with monoclonal gammopathy/plasmacytoid differentiation |
| Lymphoplasmacytic lymphoma/immunocytoma | Lymphoplasmacytic lymphoma | Lymphoplasmacytic lymphoma |
| Centrocytic | Mantle cell lymphoma | Mantle cell lymphoma Variant: blastic |
| Centroblastic-centrocytic, follicular Centroblastic-centrocytic, diffuse | Follicle center lymphoma, follicular Grade I, Grade II Follicular center lymphoma, diffuse, small cell [Provisional] | Follicular lymphoma Variants: Grade 1, 2 |
| Centroblastic, follicular | Follicle center lymphoma, follicular Grade III | Follicular lymphoma Variant Grade 3 Cutaneous follicle center lymphoma |
| | Extranodal marginal zone B-cell lymphoma (low grade B-cell lymphoma of MALT type) | Marginal zone B-cell lymphoma of MALT type |
| Monocytoid, including marginal zone | Nodal marginal zone B-cell lymphoma [provisional] | Nodal marginal zone B-cell lymphoma |
| | Splenic marginal zone B-cell lymphoma [provisional] | Splenic marginal zone B-cell lymphoma |
| Hairy cell leukemia | Hairy cell leukemia | Hairy cell leukemia |
| Plasmacytic | Plasmacytoma/myeloma | Plasma cell myeloma/Plasmacytoma |
| Centroblastic (monomorphic, polymorphic and multilobated subtypes) B-immunoblastic B-large cell anaplastic (Ki-1 ⁺) | Diffuse large-B-cell lymphoma | Diffuse large B-cell lymphoma Variants: Centroblastic, immunoblastic, T-cell or histiocyte-rich, anaplastic large cell |
| | Primary mediastinal large B-cell lymphoma | Subtype: Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma Subtype: Intravascular large B-cell lymphoma Subtype: Primary effusion lymphoma |
| Burkitt | Burkitt's lymphoma High grade B-cell lymphoma, Burkitt-like [Provisional] | Burkitt lymphoma Atypical (pleomorphic) Burkitt lymphoma |

* Offizielle Übersetzung liegt noch nicht vor ** Häufigste Lymphome in Fettdruck

Tabelle 1: Unterschiedliche Klassifikation der B-Zell Lymphome (aus Stein et al., 1999)

1.2 Pathogenese und klinische Eigenschaften der folliculären Keimzentrumslymphome

Folliculäre Lymphome repräsentieren eine spezielle Entität unter den Lymphomen mit charakteristischen Eigenschaften. Sie machen etwa 1/3 aller Non-Hodgkin Lymphome aus (in den USA etwa 40% aller NHL) und betreffen überwiegend Erwachsene. In Deutschland liegt die Inzidenz bei etwa 7-10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Nickenig et al., 2004). In den USA stieg die Inzidenz von 5-7:100.000 in den 50'er Jahren auf derzeit 13-15:100.000 Einwohner (Hiddemann, 1998).

Sie zeigen eine noduläre Architektur der Infiltration, oftmals mit einigen diffus infiltrierten Bereichen. Die meisten Patienten haben bei Erstdiagnose ein fortgeschrittenes Stadium. Befallen sind meist Lymphknoten. Aber auch Milz, Knochenmark, peripheres Blut oder andere Organe können ebenfalls betroffen sein.

Der klinische Verlauf ist individuell sehr variabel, im allgemeinen langsam progredient mit einer medianen Überlebenszeit von fünf bis acht Jahren. In 20-30% der Fälle geht ein folliculäres Keimzentrumslymphom in ein aggressives, meist centroblastisches Lymphom über. Diese Transformation ist mit einem akzelerierten Krankheitsverlauf assoziiert, der durch eine zytostatische Therapie, im Gegensatz zu primär aggressiven Lymphomen, nur kurz- bis mittelfristig beeinflusst werden kann (Hiddemann, 1998; Zelenetz et al., 1992; Nickenig et al., 2004).

1.3 Apoptose und das bcl-2 Protein

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist wichtig, um die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Zellen, die einen pathologischen Stimulus erhalten, werden durch diesen Prozess eliminiert. Resistenz gegenüber Apoptose kann ein primäres Ereignis bei der Tumorentstehung sein, wie Untersuchungen an bcl-2 transgenen und p53 defizienten Mäusen gezeigt haben. Eine Reihe von antiapoptotischen Defekten in Tumorzellen zeigten in Untersuchungen eine Resistenz u. a. gegenüber Chemotherapie und Bestrahlungstherapie. Die Apoptose von Tumorzellen konnte dagegen durch Ligation von Zelltodrezeptoren initiiert werden, die eine Aktivierung der intrazellulären Apoptosemechanismen bewirkten (Korsmeyer, 1993).

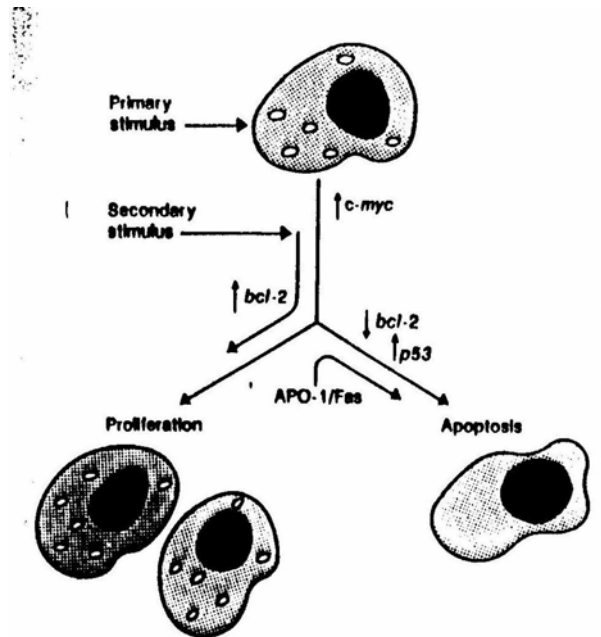


Abbildung 1: Relation zwischen Zellproliferation und Apoptose

Zellen, die durch Apoptose zugrundegehen, zeigen charakteristische morphologische Veränderungen mit Zellschrumpfung, Plasmamembranverklebung, Kernfragmentation und Pyknose. Apoptotische Zellen werden durch Phagozytose beseitigt. Dadurch bleibt eine Entzündungsreaktion aus (Reed, 1995).

1.4 Genetische Eigenschaften der folliculären Keimzentrumslymphome: Die Translokation t(14;18) (q32;q21) und das Proto-Onkogen bcl-2

Cytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass bei folliculären Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) in 50-80% und bei diffusen NHL in bis zu 30% der Fälle die Tumorzellen eine spezifische chromosomale Umlagerung, die Translokation t(14;18) (q32;q21) tragen (Weiß et al., 1987; Pezella et al., 1990; Aisenberg et al., 1988).

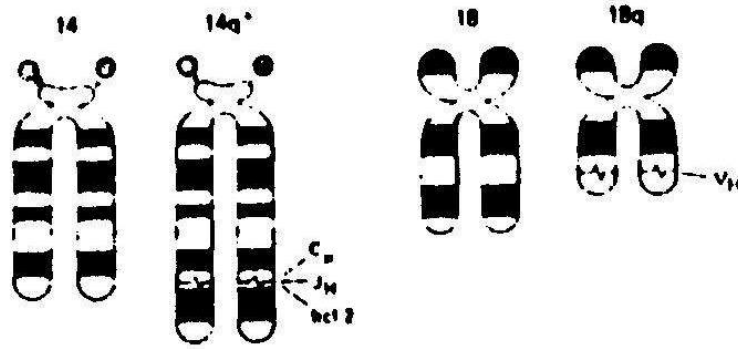


Abbildung 2: Chromosomen-Translokation in B-Zell-Lymphomen

Dabei wird das bcl-2 Proto-Onkogen, das normalerweise auf dem Chromosomensegment 18q21 lokalisiert ist, in die Region des Junctions-Genabschnitts (JH) der Immunglobulin Schwerekettensegmente (IgH) auf dem Chromosomensegment 14q32 umgelagert.

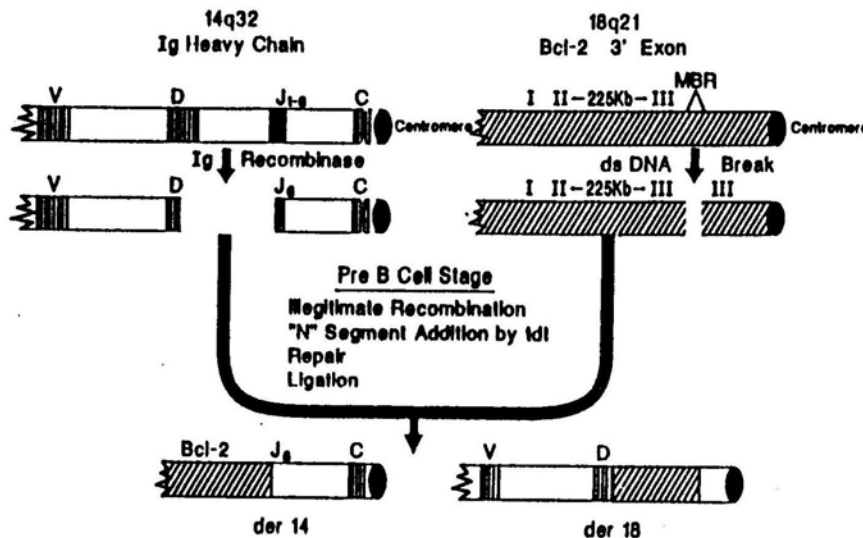


Abbildung 3: Mechanismus der Umlagerung am Bruchpunkt der Translokation t(14;18) (J, D, C, V: Junctions-, Diversitäts-, konstante und variable Gensegmente des Immunglobulin Schwerekettengens; aus Korsmeyer, 1993)

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Umlagerung im prä-B Zellstadium im Knochenmark stattfindet und als Folge eines Fehlers bei der physiologischen Umlagerung der Junctions-, Diversitäts- und variablen Abschnitte des Immunglobulin Schwerekettengens D-J oder V-D-J anzusehen ist (Yunis et al., 1982; Cleary et al., 1985; Bakhshi et al., 1985; Tsujimoto et al., 1985; Weiss et al., 1987).

Diese Genumlagerung führt zur deregulierten Synthese eines voll funktionstüchtigen bcl-2 Proteins, das den programmierten Zelltod, die Apoptose, hemmt. Wird ein langlebiger B-Lymphozyt, der diese Genumlagerung trägt, durch ein Antigen stimuliert, expandiert ein Zellklon mit maligner Potenz. Wenn man von einem „Multistep“-Mechanismus bei der Entstehung der folliculären Lymphome ausgeht, könnte das verlängerte Überleben als Schlüsselereignis angesehen werden, welches die Chance erhöht, zusätzliche genetische Defekte von Wachstums- und Proliferationsgenen (Kategorie I-Onkogene) oder Tumorsuppressorgenen (Kategorie II-Onkogene) zu erwerben (Korsmeyer, 1993).

Untersuchungen zur Pathogenese von folliculären Keimzentrumslymphomen konnten zum ersten Mal zeigen, dass einer malignen Erkrankung nicht nur eine abnorm gesteigerte Zellteilungsrate oder eine fehlende bzw. eingeschränkte Fähigkeit zur Ausdifferenzierung zugrunde liegt, sondern dass auch eine pathologisch verlängerte Überlebenszeit von Zellen, durch Hemmung oder Verlangsamung des physiologischen Prozesses der Apoptose, Grundlage der malignen Transformation sein kann (Kategorie III-Onkogene) (Korsmeyer, 1993, Lee, 1993).

Durch diese Translokation entsteht eine DNS-Sequenz, die für Lymphomzellen charakteristisch ist: eine bcl-2/JH-Hybridsequenz (Ravetch et al., 1981; Bakhshi et al., 1985).

Im bcl-2 Gen wurden zwei Regionen identifiziert, an denen die Bruchpunkte gehäuft vorkommen. Die MBR (major breakpoint region) ist bei etwa 60-70% der Translokationen betroffen, liegt in der 3' untranslatierten Region des bcl-2 Gens und umspannt einen nur 150 Basenpaare (bp) großen Genabschnitt. Die MCR (minor cluster region) ist in etwa 25% der Fälle betroffen, liegt 30 Kilobasen (kb) 3'wärts vom bcl-2 Gen und umfasst einen 500 bp langen Genabschnitt auf dem Chromosom 18. In selteneren Fällen liegt die Bruchpunktregion weiter 5'wärts vom bcl-2 Gen (Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1987; Weiss et al., 1987).

Da die Translokation für maligne Zellen charakteristisch ist, können molekulargenetische Methoden wie Polymerase Kettenreaktion und DNS-Restriktionsfragment Analyse, bzw. die Southern Blot Analyse zum Nachweis des malignen Zellklons eingesetzt werden (Lambrechts et al., 1992).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

1.5.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation

Angaben über die Häufigkeit der Translokation t(14;18) (q32;q21) bei folliculären Keimzentrumslymphomen differieren von 33% bis 89% in der Literatur. Es spielen sowohl methodologische Unterschiede bei den durchgeführten Analysen als auch geographische Unterschiede eine Rolle (Pezella et al., 1990; Benitez et al., 1992).

CYTOGENETICS

| Authors | Country | Frequency (%) |
|--------------------------------|---------|------------------------|
| Fukuhara <i>et al</i> (1979) | Japan | 4/9 (44.5%) |
| Bloomfield <i>et al</i> (1983) | U.S.A. | 18/33 (54.5%) |
| Fifth Workshop (1987) | World | 37/64 (57.8%) |
| Levine <i>et al</i> (1985) | U.S.A. | 29/48 (60.5%) |
| Koduru <i>et al</i> (1987) | U.S.A. | 14/20 (70%) |
| Ross <i>et al</i> (1989) | U.K. | 13/17 (76.3%) |
| Yunis <i>et al</i> (1987) | U.S.A. | 60/71 (84.5%) |
| Total | | 175/262 (66.8%) |

MOLECULAR BIOLOGY

| Authors | Country | Mbr | mcr | Total |
|--------------------------------|-------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Amakawa <i>et al</i> (1989) | Japan | 8/30 (26.7%) | 2/30 (6.7%) | 10/30 (33%) |
| Aisenberg <i>et al</i> (1988) | U.S.A. | 11/37 (30%) | ND | |
| Weiss <i>et al</i> (1987) | U.S.A. | 21/36 (58%) | 11/36 (30%) | 32/36 (89%) |
| Tsujimoto <i>et al</i> (1985a) | U.S.A. | 11/18 (61.1%) | ND | |
| Lipford <i>et al</i> (1987) | U.S.A. | 11/17 (65%) | ND | |
| Lee <i>et al</i> (1987a) | U.S.A. | 21/31 (67.7%) | ND | |
| De Jong <i>et al</i> (1989) | Netherlands | 14/19 (73.7%) | ND | |
| Total | | 97/188 (51.6%) | 13/66 (20%) | 42/66 (63.6%) |
| Present study | Europe | 18/51 (35.3%) | 3/51 (5.9%) | 21/51 (41.2%) |
| Total | | 115/239 (48.1%) | 16/117 (13.7%) | 63/117 (53.8%) |

ND) = not done.

Tabelle 2: Häufigkeit der Bruchpunkte am Chromosom 18 in folliculären Lymphomen in der Literatur

(aus Pezzella *et al.*, 1990)

Im Zeitraum der Durchführung unserer Untersuchung wurden in den meisten vorliegenden Studien die folliculären Non-Hodgkin Lymphome nach der „Working Formulation“ eingeteilt. Es gab zu diesem Zeitpunkt noch keine ausführlichen Untersuchungen der bcl-2 Translokation an malignen Lymphomen im deutschen Sprachraum, die nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation eingeteilt wurden.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Ermittlung der Häufigkeit der bcl-2 Translokation t(14;18) im Bereich der MBR im Knochenmark bei einer Gruppe von Patienten mit centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München.

1.5.2 Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA im Vergleich mit Histologie, Cytologie und Immunzytologie des Knochenmarks / des Blutes

Bei Lymphomen ist die histologische Untersuchung bioptisch gewonnenen Gewebematerials, vorzugsweise eines Lymphknotens, zur Diagnosesicherung obligatorisch. Die weiterführende Diagnostik dient zur Erfassung des Krankheitsstadiums (Staging) nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Sie umfasst neben bildgebenden Untersuchungsverfahren wie Sonographie des Abdomens, Röntgenuntersuchung des Thorax sowie gegebenenfalls Computertomographie, Kernspintomographie und Szintigraphie eine morphologische sowie immunologische Untersuchung von peripherem Blut und Knochenmark.

Das Limit der Detektion von malignen Zellen durch morphologische Untersuchungsmethoden liegt bei etwa 1-5%. Durch die cytogenetische Untersuchung bzw. Chromosomenanalyse kann die Translokation t(14;18) zwar zuverlässig und spezifisch detektiert werden, jedoch ist diese Analyse von der Teilungsfähigkeit der Zellen abhängig und hat ein Detektionslimit von 5%. Deshalb sind Restriktionsfragmentlängen- bzw. Southern Blot Analyse (SBA) und die in vitro Amplifikation von DNS-Sequenzen durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wegen ihrer hohen Spezifität in der Diagnostik maligner Lymphome ebenso klinisch gebräuchlich (Lee et al., 1993).

Bei der PCR werden einerseits Primer komplementär zu bekannten Segmenten der Immunglobulin-Schwerketten Genregion VH und JH am Chromosom 14 (Abbildung 4, Primer 1 und 2) sowie andererseits Primer, die komplementär sind zu bekannten häufigen Bruchpunktregionen am Chromosom 18 und der Immunglobulin-Schwerketten Genregion JH am Chromosom 14 (Abbildung 4, Primer 3 und 2) eingesetzt.

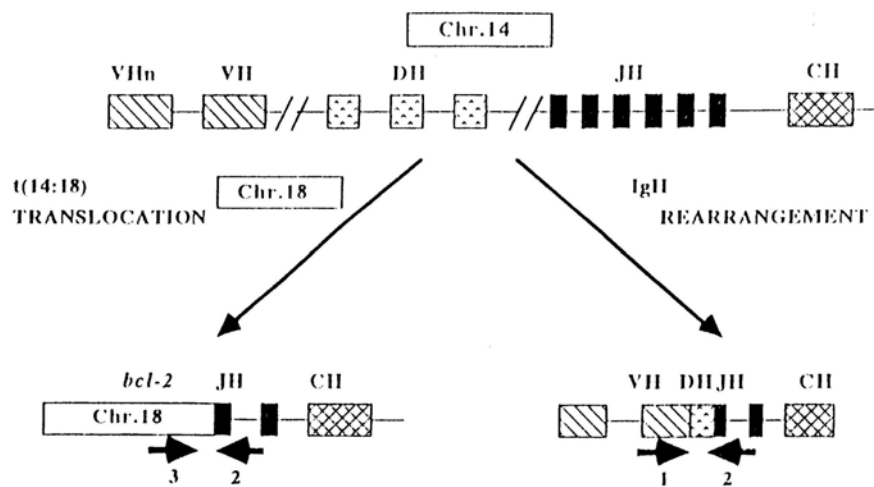


Abbildung 4: Ansatz der PCR-Amplifikation am Bruchpunkt t(14;18)

(JH, DH, CH, VH: Junktions-, Diversitäts-, konstante und variable Gensegmente des Immunglobulin Schwerkettengens)

Die molekulargenetische Untersuchung der für folliculäre Keimzentrumslymphome geradezu typischen Translokation t(14;18) (q32;q21) dient zur ergänzenden Diagnosesicherung, zur Ermittlung des Krankheitsstadiums, des Befallsmusters, zur Detektion einer minimalen Resterkrankung, zur Abschätzung der Prognose und zur Evaluierung der Therapie.

Zweites Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion im Nachweis der t(14;18) (q32;q21) Translokation im Vergleich mit der histologischen, cytologischen und immunocytoologischen Untersuchung des Knochenmarks oder des peripheren Blutes.

1.5.3 PCR und Southern Blot Analyse als Methode zur Verlaufsbeobachtung

Da bei mehr als 80% der folliculären Lymphome die Translokation t(14;18) (q32;q21) nachweisbar ist und diese Translokation mit einer Umlagerung des bcl-2 Gens und Überexpression des bcl-2 Proteins verbunden ist, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass dies in Zellen von folliculären Lymphomen die Apoptose hemmt und somit zu einem verlängerten Überleben der Zellen führt. Die bcl-2 Proteinspiegel korrelieren in mehreren Studien mit einer relativen Resistenz der Zellen gegenüber einem weiten Spektrum von Chemotherapeutika und gegenüber gamma-Strahlen (Korsmeyer, 1993; Lee, 1993).

Ob die bcl-2 Translokation auch eine prognostische Bedeutung hat wird kontrovers diskutiert. Yunis et al. (1989) berichteten über 20 Patienten mit großzelligem Lymphom, bei denen die Translokation t(14;18) mit einem schlechten Ansprechen auf Therapie und mit kurzem Überleben korreliert. Levine et al. (1988) haben keine Unterschiede im Überleben bei 30 Patienten mit folliculären Lymphomen gefunden. Pezella et al. (1992) haben 70 Fälle auf die Translokation t(14;18) und bcl-2 Protein Expression untersucht und haben keine Korrelation

mit dem Überleben gefunden.

Drittes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frage, inwieweit die PCR bzw. die Southern Blot Analyse zur Verlaufsbeobachtung bei centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen geeignet ist. Dazu wurde der Verlauf bei 7 Patienten beobachtet.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

2.1.1 Studienpopulation

Wir untersuchten 35 Patienten mit malignen Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) aus dem Patientengut des Tumorzentrums München aus den Jahren 1992 bis 1994. Davon waren 31 Patienten aus der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, drei Patienten aus dem Städtischen Krankenhaus München Schwabing und ein Patient aus der Medizinischen Klinik, Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Diagnose des centroblastisch-centrocytischen Lymphoms bzw. centroblastischen Lymphoms beruhte auf der histologischen Untersuchung des Tumorbiopsiematerials, in der Regel eines Lymphknotens, und wurde unabhängig von molekulargenetischen Befunden nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation (Lennert et al., 1975; Stansfeld et al., 1988) im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie im Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses München Schwabing gestellt. Anamnese, Befunde, Therapie- und Verlaufsdaten wurden den Dokumentationen aus den Patientenakten entnommen.

2.1.2 Materialgewinnung

Die Knochenmarksbiopsien wurden bei Erstdiagnosestellung zur Stadieneinteilung des malignen Lymphomes sowie zur Verlaufsuntersuchung während oder nach der Therapie mit Einwilligung der Patienten durchgeführt.

Von 34 Patienten wurde Knochenmark aus dem Beckenkamm in Jamshidi-Technik biopsiert und aspiriert, von einem Patienten wurde eine periphere EDTA-Blutprobe zur Diagnostik herangezogen. Das Untersuchungsmaterial wurde für die histologische und cytologische Untersuchung sowie für die immuncytologische und molekulargenetische Untersuchung aufgetrennt. Bis zum Zeitpunkt der der DNS-Extraktion wurden die Proben bei -20° C gelagert.

2.1.3 Hauptdaten der Patienten

Es wurden 35 Patienten untersucht, davon 17 Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Lymphom und 18 Patienten mit centroblastischem Lymphom. Unter den 18 Patienten mit centroblastischem Lymphom hatten 14 primäre und 4 sekundäre centroblastische Lymphome.

| | |
|---|----|
| centroblastisch-centrocytisches Lymphom | 17 |
| centroblastisches Lymphom | 18 |
| Gesamtzahl | 35 |

Tabelle 3: Diagnosen der Patienten

Das Verhältnis von männlichen und weiblichen Patienten betrug 25:10. Das Alter der Patienten bei Erstdiagnose variierte von 29 bis 88 Jahren mit einem Median von 53 Jahren.

| | |
|------------|----|
| männlich | 25 |
| weiblich | 10 |
| Gesamtzahl | 35 |

Tabelle 4: Geschlechtsverteilung der Patienten

Bei 15 Patienten handelte es sich um ein folliculäres, bei 20 Patienten um ein diffuses Lymphom.

| | |
|----------------------|----|
| folliculäres Lymphom | 15 |
| diffuses Lymphom | 20 |
| Gesamtzahl | 35 |

Tabelle 5: Verteilungsform der Non-Hodgkin Lymphome

Der klinische Beobachtungszeitraum variierte von 1 bis 212 Monate mit einem Median von 30 und einem Durchschnitt von 40.7 Monaten. 8 Patienten wurden bis zum Todeszeitpunkt beobachtet, 24 Patienten waren zum Abschluss der Verlaufsuntersuchung noch am Leben, 3 Patienten fielen vorzeitig aus der Beobachtungsgruppe heraus, da sie nicht mehr in den o. g. Kliniken weiter betreut wurden.

2.1.4 Klinisches Stadium bei Materialentnahme

Die Patientenevaluierung zur Stadieneinteilung nach der Ann Arbor Klassifizierung schloss neben einer gründlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung ein: bildgebende Verfahren wie Röntgen des Thorax, Sonographie des Abdomens, ggf. CT des Thorax und des Abdomens, morphologische und immunologische Analysen des Blutes (einschließlich

Blutbild, Lactatdehydrogenase, Thymidinkinase und $\beta 2$ Microglobin) und des Knochenmarks (Rosenberg et al., 1971).

Hauptkriterium für die Auswahl der Proben für die Knochenmarksanalyse war die Diagnose centrocytisch-centroblastisches oder centroblastisches Non-Hodgkin-Lymphom sowie ausreichende Menge (größer oder gleich 2 ml) an Knochenmarksgewebe / peripherem Blut. Das Stadium der Erkrankung und das Vorliegen eines Knochenmarksbefalls in der morphologischen Untersuchung blieben als Auswahlkriterium unberücksichtigt.

6 von 35 Patienten befanden sich bei Materialentnahme im Stadium I, 4 Patienten im Stadium II, 2 Patienten im Stadium III und 19 Patienten im Stadium IV nach der Ann Arbor Klassifikation. 9 Patienten wiesen B-Symptome auf, d. h. Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust über 10% in den letzten vier Monaten. 4 der untersuchten Patienten befanden sich in klinischer kompletter Remission nach erfolgter Chemotherapie bzw. Strahlentherapie.

| | |
|-------------------------|----|
| in kompletter Remission | 4 |
| Stadium I | 6 |
| Stadium II | 4 |
| Stadium III | 2 |
| Stadium IV | 19 |
| Gesamtzahl | 35 |
| davon B-Symptome | 9 |

Tabelle 6: Klinisches Stadium bei Materialentnahme

2.1.5 Durchgeführte Therapie vor und nach Materialentnahme

17 der untersuchten 35 Patienten hatten unmittelbar vor der Materialentnahme noch keine Therapie erhalten. Von den verbleibenden vorbehandelten 18 Patienten hatten 16 Patienten bereits eine Chemotherapie, 8 Patienten bereits eine Strahlentherapie, 6 Patienten sowohl Chemotherapie als auch Strahlentherapie erhalten.

| | |
|----------------|----|
| Therapie | 18 |
| keine Therapie | 17 |
| Gesamtzahl | 35 |

| | |
|---------------------------------|----|
| Chemotherapie / sonst. Therapie | 16 |
| Strahlentherapie | 8 |
| Chemo- und Strahlentherapie | 6 |

Tabelle 7: Behandlungsschema vor Materialentnahme

Die Therapieauswahl richtete sich nach histologischem Subtyp und Krankheitsstadium. Bei 4 Patienten wurde nach der Materialentnahme keine Therapie durchgeführt, bei 4 Patienten eine alleinige Strahlentherapie bzw. Radiatio (RTX), bei den verbleibenden 27 Patienten wurde

eine Chemotherapie (CTX), unter anderem nach Protokollen CEVED, CHOP, COAEPP, COHEPP, COP, COPP, COPBLAM, IEV, ILEB, IMVP, KNOSPE, NOSTE oder eine autologe Stammzelltransplantation (STX) durchgeführt.

| | |
|---------------------------------|----|
| keine Therapie | 4 |
| alleinige Strahlentherapie | 4 |
| Chemotherapie / sonst. Therapie | 27 |
| Gesamtzahl | 35 |

Tabelle 8: Durchgeführte Therapie nach Materialentnahme

2.1.6 Einteilung des Allgemeinzustandes nach WHO

Die Einteilung des Allgemeinzustandes der Patienten erfolgte nach der Definition des Allgemeinzustandes von Tumorpatienten nach WHO. Die bei der klinischen Untersuchung z. T. nach Karnofsky-Index beurteilten Patienten wurden zur besseren Übersicht in die Einteilung nach WHO übertragen (Abbildung 5).

Definition des Allgemeinzustandes von Tumorpatienten nach Karnofsky

| Nach WHO, SAKK, ECOG | Grade | Nach Karnofsky | Index |
|--|-------|---|-------|
| Normale körperliche Aktivität, keine besondere Pflege erforderlich | 0 | Normale Aktivität, keine Beschwerden, kein Hinweis auf Tumorleiden | 100% |
| Mäßig eingeschränkte körperliche Aktivität u. Arbeitsfähigkeit, nicht bettlägerig | 1 | Geringfügig verminderte Aktivität und Belastbarkeit | 90% |
| | | Normale Aktivität nur mit Anstrengung, deutlich verringerte Aktivität | 80% |
| Arbeitsunfähig, meist selbständige Lebensführung, wachsendes Ausmaß an Pflege und Unterstützung notwendig, weniger als 50% bettlägerig | 2 | Unfähig zu normaler Aktivität, versorgt sich selbständig | 70% |
| | | Gelegentliche Hilfe, versorgt sich weitgehend selbst | 60% |
| Unfähig sich selbst zu versorgen, kontinuierliche Pflege oder Hospitalisierung notwendig, rasche Progredienz des Leidens, mehr als 50% bettlägerig | 3 | Ständige Unterstützung und Pflege, häufige ärztliche Hilfe erforderlich | 50% |
| | | Überwiegend bettlägerig, spezielle Hilfe erforderlich | 40% |
| 100% bettlägerig krankheitsbedingt | 4 | Dauernd bettlägerig, geschulte Pflegekraft notwendig | 30% |
| | | Schwerkrank, Hospitalisierung, aktiv supportive Therapie | 20% |
| | | Moribund | 10% |

Abbildung 5: Definition des Allgemeinzustandes von Tumorpatienten nach WHO und Karnofsky

Der Allgemeinzustand / die Leistungsfähigkeit von 12 der untersuchten 35 Patienten wurde in Stufe 0, von 7 Patienten in Stufe 1, von 12 Patienten in Stufe 2, von einem Patienten in Stufe 3 und von 4 Patienten in Stufe 4 nach WHO eingeteilt.

| | |
|------------------|----|
| Allgemeinzustand | |
| Stufe 0 | 12 |
| Stufe 1 | 7 |
| Stufe 2 | 12 |
| Stufe 3 | 1 |
| Stufe 4 | 3 |

Tabelle 9: Allgemeinzustand der Patienten nach WHO-Einteilung

2.2 Evaluierung der Sensitivität und Spezifität durch Kontrollen

Zur Evaluierung der Sensitivität und Spezifität der angewendeten molekulargenetischen Nachweismethoden für die Translokation t(14;18) (q32.1;q21.3) wurden negative, positive und Leerkontrollen mituntersucht.

2.2.1 Positive Kontrolle

Die als positive Kontrolle verwendete, die Translokation t(14;18) tragende Zelllinie Karpas 422 wurde von Dyer et al., 1990 beschrieben. Diese Zelllinie, die neben der Translokation t(14;18) (q32.1;q21.3) auch andere Umlagerungen aufweist, wurde aus der Pleuraflüssigkeit einer 72 jährigen Patientin mit einem Non-Hodgkin Lymphom gezüchtet. Es stand uns davon ausreichend DNS als positive Kontrolle zur Verfügung.

2.2.2 Negative Kontrolle

Als negative Kontrolle wurde zum einen Placenta-DNS herangezogen, die aus Frischgewebe isoliert wurde und zum anderen als Fertigpräparat zur Verfügung stand. Als zusätzliche negative Kontrolle wurde DNS aus Knochenmarkspunktaten von einem Patienten mit T-Zell Non-Hodgkin Lymphom, einem Patienten mit centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom und einem Patienten mit Morbus Hodgkin isoliert.

2.3 Morphologische Untersuchung des Knochenmarks

Nach der Punktion wurde der Ausstrich aus der Aspirationsflüssigkeit in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der LMU München nach entsprechender Färbung mikroskopisch unter anderem auf Befall durch Lymphomzellen untersucht.

Die Knochenmarksbiopsate, d. h. die Stanzzyylinder, wurden im Pathologischen Institut der Universität München histologisch auf Befall durch Lymphomzellen untersucht.

Die Detektionsrate der cytologischen und histologischen Untersuchung im Nachweis eines Knochenmarksbefalls durch Lymphomzellen liegt bei etwa 1:20 Zellen, d. h. bei 5% (Gribben et al., 1994; Horsman et al., 1994; Reed et al., 1995).

2.4 Immuncytologische Untersuchung

Mittels monoklonaler Antikörper lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Antigenkonstellationen eine Reihe von peripheren B-Zell Lymphomen unterscheiden. Es wurden sowohl periphere EDTA-Blutproben als auch heparinisierte Knochenmarkspunktate

mit einem Durchflußzytometer (FACScan) auf die Expression B-Zell assoziierter Antigene untersucht und damit ein Antigenprofil des Lymphoms erstellt. Als Material wurde 20 ml heparinisieretes Vollblut, 2 ml EDTA-Blut oder 2-5 ml heparinisieretes Knochenmarkspunktat verwendet.

Patienten mit einem centroblastisch-centrocytischem NHL (CB-CC) zeigen eine konstante Expression des Common-ALL-Antigens (CD10) bei gleichzeitiger Negativität von CD5. Bei etwa 60-70% der centroblastischen B-NHL (CB) lassen sich Oberflächenimmunglobine vom Typ IgM nachweisen, in etwa 25 % findet sich auch hier das Common-ALL-Antigen (CD10) (Adorf et al., 2004).

Die Oberflächenantigene CD19 und CD20 werden auf Vorläuferzellen der B-Zell-Reihe nachgewiesen. CD22 sind spezifische Oberflächenantigene von B-Zellen. Diese lassen sich in über 90% der Fälle auf Zellen der B-Zell-Reihe nachweisen.

Die Sensitivität der Durchflußzytometrie bei der Erkennung eines Knochenmarksbefalls durch maligne Zellen ist wesentlich sensitiver die der morphologischen Methoden und liegt bei 0.1-0.5% (Adorf et al., 2004).

Auswahl häufig verwendeter monoklonaler Antikörper mit definierter Clusterbezeichnung:

| Cluster | Antigenexpression/vorwiegende Reaktivität |
|--------------------------|---|
| CD1a | cortical thymocytes, dendritic cell subset, Langerhans cells, B-cell subset; |
| CD2 | T-cells, most NK-cells; |
| CD3 | surface expression on mature T-cells; cytoplasmatic expression in immature T-cells; |
| CD4 | Helper/inducer cells; monocytes, macrophages; |
| CD5 | T-cells; B-cell subset; |
| CD7 | T-cells; NK-cells; immature myeloid cell subset; |
| CD8 | cytotoxic/suppressor T-cells; NK-cell subset; cortical thymocyte subset; |
| CD10 | pre-B-cell subset; B-cell subset; neutrophils; cortical thymocyte subset; |
| CD11b | monocytes, macrophages; neutrophils; NK-cells; |
| CD11c | monocytes, macrophages; neutrophils; B-cell subset; |
| CD13 | myeloid cells; |
| CD14 | monocytes; weak expression on neutrophils; |
| CD15 | neutrophils; weak expression on monocytes; |
| CD16a | NK-cells; macrophages; |
| CD16b | granulocytes; |
| CD19 | precursor B-cells, mature B-cells; |
| CD20 | precursor B-cell subset; mature B-cells; follicular dendritic cells; |
| CD22 | surface expression on B-cells; cytoplasmatic expression in precursor B-cells; |
| CD23 | B-cell subset; monocytes; dendritic cells; eosinophils; platelets; |
| CD25 | activated T- and B-lymphocytes; activated macrophages; |
| CD30 | activated T- and B-lymphocytes; Reed Sternberg cells; |
| CD33 | pan myeloid; majority of monocytic cells; |
| CD34 | hematopoietic progenitor cells; endothelial cells; |
| CD38 | plasma cells; thymocytes; activated T- and B-cells; monocytes; precursor cells; |
| CD41a | platelets; megakaryocytes; |
| CD42a, b, c, d | platelets; megakaryocytes; |
| CD43 | all T-lymphocytes; most B-lymphocytes; neutrophils; monocytes; platelets; |
| CD44 | leucocytes, erythrocytes; |
| CD45 | all leukocytes; |
| CD56 | NK-cells; some T-cells; |
| CD57 | NK-cell subset; T-cell subset; |
| CD61 | platelets; megakaryocytes; |
| CD65 | neutrophils; |
| CD71 | proliferating cells; |
| CD79a,b | B-cells; |
| CD103 | mucosa associated T-lymphocytes; human mucosal lymphocyte HML-1; |
| CD117 | hematopoietic progenitor cells; c-kit; stem cell factor receptor; |
| CD138 | B-cells; plasma cells; |
| CD238 | glycophorin A: erythrocytes; erythroblasts; erythroid precursor cells; |
| Bisher nicht geclustert: | |
| HLA-DR | B-lymphocytes; activated T-lymphocytes; monocytes; blasts; |
| MPO | myeloperoxidase; lysosomal expression in neutrophils and monocytes; |
| TdT | nuclear expression in lymphoid precursor cells; |
| TCR $\alpha\beta$ | T-Zell-Rezeptor alpha/beta |
| TCR $\gamma\delta$ | T-Zell-Rezeptor gamma/delta |
| kappa | surface expression on B-lymphocytes; cytoplasmatic expression in plasma cells; |
| lambda | surface expression on B-lymphocytes; cytoplasmatic expression in plasma cells; |
| sIgM | surface expression on mature B-cells; |
| FMC7 | B-cell subset |

Tabelle 10: Häufig verwendete monoklonale Antikörper mit definierter Clusterbezeichnung

(aus Adorf et al., 2004)

2.5 Molekulargenetische Untersuchung

2.5.1 DNS-Präparation

Bei allen nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritten wurden Vorkehrungen zur Vermeidung von Kontamination nach Empfehlung von Sambrook et al., 1989 und Kwok et al., 1989 eingehalten.

Für die Extraktion und Reinigung von Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus Knochenmarkspunktaten bzw. aus separierten Zellen des peripheren Blutes wurden folgende Materialien und Geräte eingesetzt:

Rotor, Bender, München
Zentrifuge Rotanta, Hettlich, Tuttlingen
Chloroform, Sigma (Cat. No. C 2432)
Isopropanol, Sigma (Cat. No. I 9516)
NaCl, Sigma (Cat. No. S 3014)
Phenol (equilibriert in TE-Puffer), Sigma (Cat. No. P 4557)
Tris-HCl, Boehringer Mannheim (Cat. No. 812846)
Harnstoff, Sigma (Cat. No. U 5378)
EDTA 10 mM, Apotheke des Klinikums Innenstadt der Universität München
SDS-Lösung, Apotheke des Klinikums Innenstadt der Universität München

In Falcon-Röhrchen wurde das Knochenmarkspunktat bzw. die peripheren Blutzellen nach Auftauen durch schrittweises Zugabe von Harnstoff-Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA, 7 M Harnstoff, pH 7.5) unter kontinuierlichem Rühren mit einem Glasspatel auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Bei diesem Arbeitsschritt werden Zellmembranen lysiert. Danach wurde 2 ml 10% ige SDS-Lösung dazugegeben und das Zelllysate über 10 Min. bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Durch Zugabe von 5 ml einer Chloroform-Isopropanol Mischung im Verhältnis 24:1 sowie 10 ml Phenol und anschließendes langsames Mischen über 10 Min. auf einem Rotor wurden Proteine und andere zelluläre Bestandteile denaturiert. Nach Zentrifugieren bei 1200 x g wurde die nun von der unteren organischen Phase abgetrennte wässrige Nukleinsäurelösung abpipettiert. Dieser Arbeitsschritt wurde mindestens einmal wiederholt. Danach wurde 5 ml Chloroform-Isopropanol Mischung im Verhältnis 24:1 beigemischt und erneut zentrifugiert, um Reste von Phenol aus der Nukleinsäurelösung zu entfernen.

Die DNS wurde durch Zugabe von 25 ml -20° C kaltem 96% igem Ethanol in die Lösung in Form langer Fädenknäuel präzipitiert. Nach Waschen mit -20° C kaltem 70% igem Ethanol und Zentrifugieren bei 1200 x g wurde das Sediment luftgetrocknet und anschließend mit sterilem Aqua dest. resuspendiert.

2.5.2 Photometrische Quantifizierung der DNS

Nukleinsäuren absorbieren Licht von 260 nm Wellenlänge in Abhängigkeit von ihrer Konzentration in einer Lösung. Proteine haben ein Absorptionsmaximum für Licht bei 280 nm. Je höher das Verhältnis des Absorptionswertes A bei 260 und 280 nm, A_{260}/A_{280} ist,

um so geringer ist die Verunreinigung der Lösung mit Proteinen. Das Verhältnis für reine DNS beträgt 2.0, angestrebt wird ein Verhältnis um 1.8. Bei reiner DNS entspricht ein Absorbtionswert A260 von 1.0 etwa einer Konzentration an Doppelstrang-DNS von 50 µg/ml (Ausubel et al., 1992).

Für die photometrische Quantifizierung der DNS wurden folgende Materialien und Geräte herangezogen:

- UV-VIS Spectrophotometer (Shimadzu UV-1202)
- Quartz-Küvetten (Hellma, Typ Nr. 104-QS)
- DNS-Standards
- 1 x TNE Puffer (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200mM NaCl, pH 7.4)
- Parafilm

In Quartz-Küvetten wurden 990 µl TNE-Puffer pipettiert, bei Licht von 260 nm Wellenlänge die Leerwerte bestimmt, die Nulleichung durchgeführt und kontrolliert. Nach Zugabe von 10 µl DNS und Mischen der Lösung erfolgte die Bestimmung der Absorbtionswerte A260. Nach erneuter Nulleichung erfolgte die gleiche Messreihe bei Licht von 280 nm Wellenlänge.

Die DNS-Konzentration ([DNS]) in der gewonnenen Lösung ergab sich aus der Formel:

$$[\text{DNS}] = \text{A260-Wert} \times 50 \times (\text{Verdünnungsfaktor})^{-1} [\mu\text{g/ml}]$$

$$\begin{aligned} [\text{DNS}] \text{ im Versuchsansatz} &= \text{A260-Wert} \times (50 \times 100) [\mu\text{g/ml}] \\ &= \text{A260-Wert} \times 5000 \mu\text{g/ml} \\ &= \text{A260-Wert} \times 5 [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \end{aligned}$$

Die Reinheit der DNS ergab sich aus der Formel:

$$\text{DNS-Reinheitsfaktor} = \text{A260}/\text{A280} [\text{Minimumwert } 1; \text{Maximumwert } 2]$$

Zur Berechnung eines Näherungswertes für die Konzentration der reinen DNS in der jeweiligen Lösung wurde der DNS-Reinheitsfaktor folgendermaßen in die Formel einbezogen:

$$[\text{DNS}] = \text{A260-Wert} \times 50 \times (\text{Verdünnungsfaktor})^{-1} \times \text{DNS-Reinheitsfaktor} \times 1/2 [\mu\text{g/ml}]$$

$$[\text{DNS}] \text{ im Versuchsansatz} = \text{A260-Wert} \times (50 \times 100) \times \text{DNS-Reinheitsfaktor} \times 1/2 [\mu\text{g/ml}]$$

$$= \text{A260-Wert} \times 2500 \times \text{DNS-Reinheitsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$$

$$= \text{A260-Wert} \times 2.5 \times \text{DNS-Reinheitsfaktor} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Bei den von 35 Patienten gewonnenen DNS-Lösungen variierte der Reinheitsfaktor von 1.2 bis 1.9 mit einem Mittelwert von 1.5, der DNS-Gehalt in den Lösungen variierte von 0.2 bis 2.45 µg/µl mit einem Mittelwert von 0.77 µg/µl.

2.5.3 Southern Blot Analyse genomischer DNS

Unter dem von Southern entwickelten Verfahren versteht man im engeren Sinne die Übertragung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nitrocellulose- oder Nylon-Membranen durch Vakuum oder Kapillarkraft. Bei der Restriktionsfragment-Analyse, im folgenden als Southern Blot Analyse bzw. SBA bezeichnet, können nach anschließender Hybridisierung mit spezifischen, radioaktiv bzw. nicht radioaktiv markierten Gensonden homologe DNS-Fragmente detektiert werden (Southern, 1975).

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die die DNS ausschließlich an einer definierten kurzen Nukleotidsequenz erkennen und schneiden. Eine internationale Enzymeinheit IE ist definiert als die Enzymaktivität, die 1 µg DNS bei 37°C in 1 Stunde in einem Gesamtvolumen von 50-100 µl im entsprechenden Inkubationspuffer vollständig spaltet. Die in verschieden große Fragmente geschnittene DNS kann anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert werden. Eine Genumlagerung führt zu einer Verlängerung oder Verkürzung des zugehörigen Fragments und somit zu einer Verschiebung der Bande im Gel im Vergleich zur Lage der Keimbahnbande (Germline).

GEL = Elektrophorese Datum: _____

Enzyme: _____

Neue Chargen: _____

| Nr. | Probe | µl DNA | µl H ₂ O | µl Enzyme | µl Puf | µl So | µl H ₂ O |
|-----|-------|--------|---------------------|-----------------|--------------|-----------|---------------------|
| 1 | | | | | | | |
| 2 | | | | | | ul/Ansatz | |
| 3 | | | | X | | Ansätze | |
| 4 | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | |
| 17 | | | | Elpho: L R | TAE von: | | Mal: |
| 18 | | | | sa: | U/I, Beginn: | | |
| 19 | | | | Dauer: | U/I, Ende: | | |
| 20 | | | | Hybridisierung: | Datum: | | Probe: |

Bemerkungen: _____

Abbildung 6: Protokoll einer Southern Blot Analyse

2.5.3.1 Spaltung der DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Für die Spaltung der präparierten hochmolekularen DNS mittels Restriktionsendonukleasen wurden folgende Materialien und Geräte herangezogen:

Bakterielle Restriktionsenzyme mit zugehörigen Inkubationspufferlösungen:

- Bam HI (G ↓ GATCC), Boehringer M (Cat. No. 656275)
 - Eco RI (G ↓ AATTC), Boehringer M (Cat. No. 1175084)
 - Hind III (A ↓ AGCTT), Boehringer M (Cat. No. 656313)
- (↓ = Schnittstelle)

Wasserbad, Julabo SW-20C

Um sicherzustellen, dass die beim Enzymverdau entstehenden DNS-Fragmente sich in ihrer Länge signifikant unterscheiden, wurden je Versuchsansatz drei verschiedene, bei Lymphomanalysen bewährte Restriktionsendonukleasen bakterieller Herkunft, und zwar Bam HI, Eco RI sowie Hind III, eingesetzt (Christgau, 1995).

In Eppendorf-Röhrchen mit jeweils 10 µg Patienten- oder Placenta-DNS wurden Inkubationspuffer sowie einer Aktivität von 50 internationalen Einheiten (IE) entsprechende Menge des jeweiligen Restriktionsenzym zugegeben und mit Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde zum Enzymverdau für 2 Stunden in 37° C warmem Wasserbad inkubiert. Um die DNS-Spaltung zu beenden wurden die Enzyme durch kurzes Erhitzen auf 95° C inaktiviert.

2.5.3.2 Agarose-Gelelektrophorese der genomischen DNS

Um die entstanden unterschiedlich großen DNS Restriktionsfragmente nach ihrer Größe aufzutrennen wurde eine horizontale Gelelektrophorese in 0.8% Agarose im elektrischen Spannungsfeld unter Verwendung folgender Materialien und Geräte durchgeführt.

DNS Molekulargewichtsmarker I, Boehringer M (Cat. No. 236233)
DNS Molekulargewichtsmarker II, Boehringer M (Cat. No. 236250)
Ethidium Bromid, Sigma (Cat. No. E 1510)
Agarose, Sigma (Cat. No. A 9539)
Elektrisches Spannungsgerät, Power Supply, BRL, H4, Gaithersburg, USA
Gelelektrophoresekammer, horizontal (Gibco, Cat. No. 11068-012)
Gelträger, UV-durchlässig, Gel-Kämme (Gibco, Cat. No. 11084-019)
Elektrophoresepuffer: 10 x TAE-Puffer (2M Tris-Acetat, 0.05M EDTA, pH 8.5)
Gelladepuffer, Loading Buffer
(0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylene Cyanol, 25% Ficoll Type 400)
UV Transilluminator, Bachhofer, Reutlingen
Polaroid MP-4 Kamera System (Sigma, Cat. No. MP-4P)
Polaroid Black and White Print Film, Type 667 (Sigma, Cat. No. MP-4P)

Nach Polymerisation des 0.8% igen, in 1 x TAE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid 5µl/100 ml versehenen Gels in dem vorbereiteten Gelträger wurden pro Gellauf jeweils vier Patienten-DNS Proben, Placenta-DNS als Keimbahnbanden Standard in drei unterschiedlichen Enzymspaltungen sowie Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der nach Interkalation mit der DNS im UV-Licht fluoresziert, wodurch diese sichtbar gemacht wird.

Durch Vergleich mit gleichzeitig mitlaufenden DNS-Molekulargewichtsmarkern gelang es, die Größe der aufgetrennten DNS Fragmente zu bestimmen. Die zurückgelegte Strecke im Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des DNS-Molekulargewichts. Die verwendeten DNS Molekulargewichtsmarker ergaben Fragmente folgender Basenpaargrößen:

DNS Molekulargewichtsmarker I: 21.226, 7.421, 5.804, 5.643, 4.878, 3.530 bp.
DNS Molekulargewichtsmarker II: 2.310, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 bp.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit je 5 µl Gelladepuffer vermischt, um ein Vermischen der Proben mit der Pufferlösung zu verhindern und um den Gellauf anhand der blauen Bromphenol- und Cyanolbanden zu überwachen.

Nach Auftrennung der DNS-Fragmente über 16 Stunden bei einer Spannung von 40 Volt

wurde das Gel mit einem Lineal als Längenstandard zur Dokumentation auf einen Transilluminator gelegt und unter UV-Licht von 320 nm Wellenlänge abphotographiert. Zur Photodokumentation diente eine über der UV-Lichtquelle montierte Sofortbildkamera (Polaroid SX70, Sigma). Mit einer 11er Blende und mit einem Gelbfilter wurde bei 1 Sek. Belichtungszeit eine optimale Bildqualität erzielt.

2.5.3.3 Vakuum-Blotten der genomischen DNS

Für den Vakuum-Transfer (Blotten) der aufgetrennten DNS auf eine Nylonmembran wurden folgende Materialien und Geräte verwendet:

VacuGene Blot System mit Vakuumpumpe, Typ 2016–100, LKB
 Backofen, Memmert 1400 W
 Gelträgerplatte, luftdurchlässig, Support Screen, Typ 80-1258-68, LKB
 Plastikmasken in Größe des Gels
 Nylonmembran Hybond N, Amersham, Braunschweig
 20 x SSC-Puffer (3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH 7.0)
 10 x SSC-Puffer (1.5M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH 7.0)
 Depurinatlösung (0.25M HCl)
 Denaturierungslösung (1.5M NaCl, 0.5M NaOH)
 Neutralisierungslösung (1.5M NaCl, 1M Tris-HCl, pH 8.0)

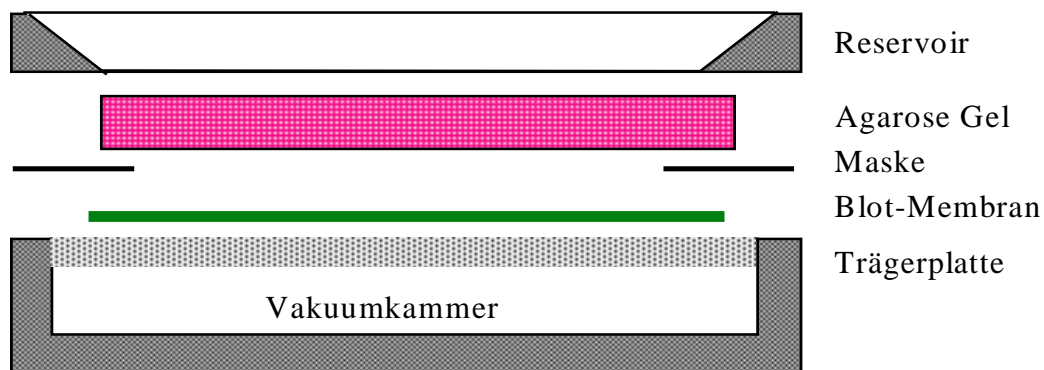


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Vakuum-Transfer Systems

Eine ungeladene Hybond N Nylonmembran wurde entsprechend der Gelgröße zugeschnitten, auf die Trägerplatte gelegt, angefeuchtet. Vor dem Blotten wurde das DNS-Agarosegel vorbehandelt, um doppelsträngige DNS-Fragmente in einzelsträngige Formen zu überführen. Die Gele wurden in einer Depurinatlösung für 5 Min. in kleinere, leichter auf die Blot-Membran übertragbare Stücke geschnitten, anschließend für 15 Min. in einer Denaturierungslösung in Einzelstränge überführt. Nach Belassen in einer Neutralisierungslösung für 30 Min. erfolgte der Transfer auf die Nylonmembran in 20 x SSC-Puffer über 4 Stunden bei einem Unterdruck von 40 cm H₂O, der von einer Vakuumpumpe aufgebaut wurde.

Nach Markierung und Beschriftung der Nylonmembran zur späteren Orientierung, Waschen in 2 x SSC Puffer und Trocknen erfolgte die kovalente Fixierung der DNS auf der Nylonmembran durch Backen über zwei Stunden bei 80° C im Backofen.

2.5.3.4 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden

Bei allen Arbeitsschritten mit radioaktiven Reagenzien wurden die „Richtlinien des Referates für Strahlenschutz II B 4 der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Arbeiten mit radioaktiven Materialien und die zentrale Entsorgung radioaktiver Stoffe“ eingehalten.

Für die radioaktive Markierung der Gensonden und die Hybridisierung wurden folgende Materialien und Geräte eingesetzt:

Hybridisierungsöfen, MK II, Hybaid
Schüttelwasserbad, SW 20 C, Julabo
Rotor, Bender
Geigerzähler, Kontaminationsmonitor, LB 1210, Berthold
Laminar Air Flow Arbeitsplatz, Haraeus
Schüttelgerät Typ 81, Bühler
Hybridisierungsröhrchen, MWG Biotech
Folienschweißgerät Vacupack 2 plus mit passenden Folien
Röntgenfilm X-O Mat AR, Kodak
Filmkassetten 180 x 240 mm, Kodak
Röntgenverstärkerfolien, Cronex Lightning Plus, Dupont
JH DNS-Sonde (Oncogene Science, Cat. No. HTP 2a)
bcl-2 DNS-Sonde (Oncogene Science, Cat. No. HTP 1a)
Multiprime DNS Labeling System: Hexanucleotid Primer Mixture, dGTP, dTTP, Reaktionspuffer, Klenow Enzym, (Amersham, Cat. No. RPN 1600Y)
[α -³²P] dATP redi vue, 6000 Ci/mmol (Amersham, Cat. No. AA 0074)
[α -³²P] dCTP redi vue, 6000 Ci/mmol (Amersham, Cat. No. AA 0075)
EDTA, 0.5 M, pH 8.0
Bovines Serum Albumin, (Sigma, Cat. No. A-7030)
Dinatriumhydrogenphosphat, Na₂HP04 (Sigma, Cat. No. S-3264)
85% Phosphorsäure, H₃P04 (Merck, Cat. No. 573.1000)
20% SDS

Die von der Fa. Oncogene Science bezogene JH DNS-Sonde, ein 5.4 kb langes humanes genomisches DNS-Fragment, das komplementär zum Junktions-Genabschnitt der Immunglobulin-Schwerkettengensegmente (JH-Region) auf dem Chromosom 14q32.1 liegt, hybridisiert mit folgenden Restriktionsfragmenten einer Keimbahn-DNS, z. B. Placenta-DNS:

| | |
|----------|---------|
| Eco RI | 18.0 kb |
| Bam HI | 18.0 kb |
| Hind III | 11.0 kb |

Die von der Fa. Oncogene Science bezogene bcl-2 DNS-Sonde, ein 2.7 kb langes humanes genomisches DNS-Fragment, das komplementär zur MBR (major breakpoint region) auf dem Exon 2 des bcl-2 Gens auf dem Chromosom 18q21.3 liegt, hybridisiert mit folgenden Restriktionsfragmenten einer Keimbahn-DNS:

| | |
|----------|---------|
| Eco RI | 5.2 kb |
| Bam HI | 23.0 kb |
| Hind III | 4.2 kb |

Hybridisierten die Proben mit anderen als den o. g. Restriktionsfragmenten, war von einer Umlagerung der JH- bzw. bcl-2 Region auszugehen. Hybridisiert sowohl die JH als auch die bcl-2 DNS-Sonde mit dem gleichen Restriktionsfragment, die eine andere Länge als die Keimbahnbande hat, ist von einer bcl-2/JH-Translokation, t(14;18) im Bereich der MBR auszugehen, da in diesem Fall die JH und bcl-2 Gensegmente durch Translokation zueinander in räumliche Nachbarschaft gelangen.

Die radioaktive Markierung der JH und bcl-2 DNS-Sonden wurde nach der von Feinberg et al., 1983 beschriebenen, sog. „Random Priming“ Methode durchgeführt. Dabei lagern sich Hexanukleotide von zufälliger Sequenz quasi als Primer an die zuvor denaturierte DNS-Probe an. Das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I kann ausgehend von diesen Primern Nukleotide, sowohl radioaktive, mit 6000 Ci/mmol ^{32}P -markierte Nukleotide [α - ^{32}P] dATP und [α - ^{32}P] dCTP, als auch herkömmliche dGTP und dTTP als komplementären Strang synthetisieren.

Jeweils 1 μl (entsprechend 50 ng) der zu markierenden JH DNS-Sonde wurde 10 Min. lang bei 95° C denaturiert, auf Eis schockgekühlt und 60 Min. lang mit dem folgenden Reaktionsansatz inkubiert:

| | |
|---------------------|--|
| 5 μl | Hexanucleotid Primer Mixtur |
| 5 μl | Multiprime Reaktionspuffer |
| 4 μl | dTTP |
| 4 μl | dGTP |
| 5 μl | [α - ^{32}P] dATP redi vue, 6000 Ci/mmol |
| 5 μl | [α - ^{32}P] dCTP redi vue, 6000 Ci/mmol |
| ad 48 μl | Aqua dest. |
| 2 μl | Klenow Enzym (2 IE/ μl) |
| 50 μl | Gesamtmenge |

Tabelle 11: Versuchsansatz der Hybridisierung mit radioaktiv markierten Gensonden

Bei dieser Reaktion wird im Regelfall ein radioaktiv markiertes Nukleotid ([α - ^{32}P] dNTP) pro etwa jedes 20. bis 25. Nukleotid eingebaut. Die Markierung der DNS-Sonden wurde durch Zugabe von 1 μl 0.5 M EDTA-Lösung beendet.

Die Hybridisierungsreaktion, d. h. Bildung von spezifischen Hybriden der jeweiligen radioaktiv markierten JH oder bcl-2 DNS-Probe und der elektrophoretisch aufgetrennten Patienten-DNS Fragmenten auf der Nylonmembran wurde nach bereits beschriebenen Methoden durchgeführt (Church et al., 1984).

Die Nylonmembran wurde in ein Hybridisierungsrohr eingerollt und für 10 Min. bei 65° C in 50 ml Hybridisierungslösung (1% Bovines Serum Albumin, 1mM EDTA, 7% SDS, 0.5M NaHP04-Puffer, pH 7.2) prähybridisiert. Dadurch sollen freie Bereiche und unspezifische Ladungsträger auf der Nylonmembran abgesättigt und somit der bei der Detektion der Banden störende Hintergrund reduziert werden. Anschließend wurde die radioaktiv markierte DNS-Probe über 10 Min. bei 95° C denaturiert, eiskühlt und mit 25 ml der Hybridisierungslösung in das Hybridisierungsrohr mit der Nylonmembran gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte anschließend über 12 Stunden bei 65° C im Hybridisierungsofen unter kontinuierlichem langsamem Mischen durch Rotation.

Anschließend wurden die Nylonmembranen zweimal über 20 Min. in einer Waschlösung (40mM NaHP04, 0.5% bovinem Serum-Albumin, 1mM EDTA, 5% SDS) in Edelstahlbehältern bei 65° C im Schüttelwasserbad gewaschen. Nach Überprüfung mit einem Geigerzähler, ob die radioaktive Strahlung auf einzelne Bereiche der Nylonmembran begrenzt war, wurden die Membranen in dünne Plastikfolien verpackt und in der Dunkelkammer zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-O Mat) zwischen zwei Verstärkerfolien zur Autoradiographie in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In wenigen Fällen musste der Waschvorgang aufgrund störender Hintergrundstrahlung wiederholt werden. Bei regelrechtem Reaktionsablauf erschienen auf dem Röntgenfilm schwarze Banden an Stellen, an denen die radioaktiv markierte DNS-Sonde an die entsprechenden Restriktionsfragmente auf der Nylonmembran binden konnte. Die Autoradiographie erfolgte bei -70° C entsprechend der Stärke der entstandenen Banden auf dem Röntgenfilm über 3 Tage bis z. T. mehr als zwei Wochen. Die Nylonmembranen wurden anschließend in Aqua dest. über 1 Stunde bei 65° C dehybridisiert und unter den gleichen Bedingungen mit der bcl-2 DNS-Sonde rehybridisiert.

2.5.4 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine enzymatische Methode, mit deren Hilfe in vitro innerhalb weniger Zyklen ein DNS-Segment spezifisch amplifiziert werden kann. Die Methode basiert auf der Anwendung einer temperaturstabilen DNS-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) gewonnen wird. Die Größe des amplifizierten Fragments wird durch zwei spezifische Primer bestimmt, die komplementär zu der zu amplifizierenden DNS sind. Durch wiederholtes Aufschmelzen der DNS (Denaturierung), Hybridisieren der Primer an die Ziel- bzw. Template-DNS (Anlagerung, „Annealing“) und einen nachgeschalteten, Taq-Polymerase abhängigen Syntheseschritt kann eine Amplifikation der Ausgangs-DNS um einen Faktor von 10^8 - 10^9 erzielt werden (Saiki et al., 1986, Bell, 1989).

2.5.4.1 PCR-Versuchsbedingungen

Zum Nachweis der Translokation t(14;18) (q32.1;q21.3) des bcl-2 Onkogens in die JH-Region mittels Polymerase Kettenreaktion als zweite molekulargenetische Nachweismethode wurden folgende Materialien und Geräte eingesetzt.

DNS Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus
TransPrimer Set, MBR Primer, Oncogene Science (Cat. No. APS 04)
(Primer MBR 1, MBR 2, JH 1, 10 x Gene Amp PCR Puffer)
Deoxynucleotid Set (4x 100 mM dNTP), Pharmacia (Cat. No.27-2035)
10 x PCR Puffer + MgCl₂-Lösung Perkin Elmer Cetus (Cat. No.N808-0010)
Taq DNS Polymerase, Boehringer M (Cat. No. 1146173)
AmpliWax PCR Gem 50, Perkin Elmer Cetus, (Cat. No. N808-0100)

Die Empfehlungen zur Vermeidung von Kontamination und zur optimalen Gestaltung eines PCR-Labors wurden eingehalten (Kwok et al., 1989; Orrego et al., 1990).

Als Primer wurde der TransPrimer MBR Set der Fa. Oncogene Science herangezogen. Der Einsatz der Primerpaare MBR 1 und JH 1 amplifiziert die Mehrzahl der bcl-2 / JH Translokationen t(14;18) (q32.1;q21.3), bei welchen der Bruchpunkt in Position 2.690 bp oder 3'wärts (MBR Region des bcl-2 Gens) liegt. Die genaue Sequenz dieser Oligonukleotidprimer wurde von der Firma nicht bekannt gegeben. Nur im Falle einer Translokation ist ein Amplifikat von 100-500 bp Länge detektierbar (Cleary et al., 1985, Bakhshi et al., 1985).

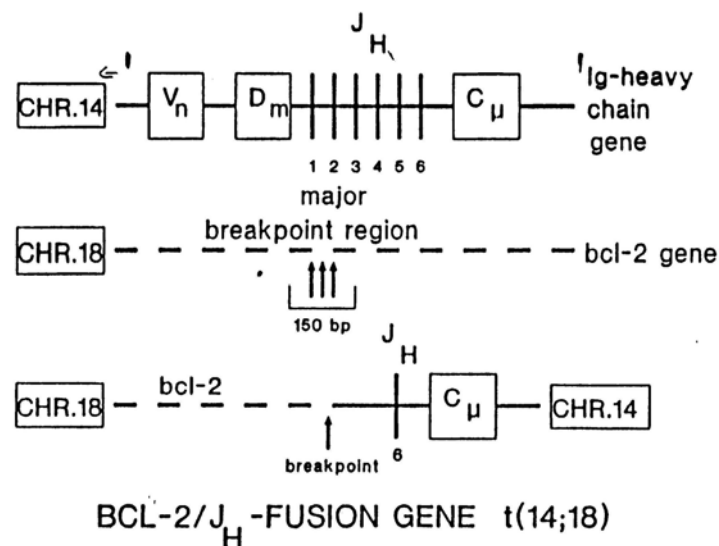


Abbildung 8: Ansatz der PCR-Amplifikation an JH und MBR

Zur Kontrolle, ob der Versuchsansatz erfolgreich ablief, erfolgte der Einsatz der Primerpaare MBR 1 und MBR 3, die das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens amplifizieren. Ein Amplifikat von 202 bp Länge muss bei jeder korrekt abgelaufenen PCR detektierbar sein.

PCR

Datum des Versuchs : _/ _/ _

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| Aqua dest. | | | | | | | | | | |
| Puffer (Fa.:) | | | | | | | | | | |
| MgCl ₂ | | | | | | | | | | |
| dNTP | | | | | | | | | | |
| 1. Primer: | | | | | | | | | | |
| 2. Primer: | | | | | | | | | | |
| 3. Primer: | | | | | | | | | | |
| 4. Primer: | | | | | | | | | | |
| Probe (7 min 95°C) | | | | | | | | | | |
| Taq Polymerase | | | | | | | | | | |

THERMOCYCLER

| | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Temp. | min | Prog.Nr. |
| <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> |
| Anzahl der Zyklen | | <input type="text"/> |

BEMERKUNGEN

| | |
|-----------|----------------------|
| Probe 1: | <input type="text"/> |
| Probe 2: | <input type="text"/> |
| Probe 3: | <input type="text"/> |
| Probe 4: | <input type="text"/> |
| Probe 5: | <input type="text"/> |
| Probe 6: | <input type="text"/> |
| Probe 7: | <input type="text"/> |
| Probe 8: | <input type="text"/> |
| Probe 9: | <input type="text"/> |
| Probe 10: | <input type="text"/> |

DOKUMENTATIONS-FOTO

Abbildung 9: PCR-Protokoll

Der 50 µl Standard-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:
jeweils 2 µl der beiden Oligonukleotidprimer MBR 1 oder MBR 2 und JH 1 (25 pmol/µl)
(Endkonzentration 1 µmol/l)

8 µl der Desoxynukleotidphosphatlösung (dNTP) (1.25 mmol/l)
(Endkonzentration 200 µmol/l dATP, dCTP, dTTP, dUTP)

2 µl des 10-fach konzentrierten PCR Amplifikationspuffers
(100 mmol/l Tris-HCl, 250 mmol/l KCl, pH 8,3)

2 µl der MgCl₂-Lösung (25 mmol/l)
(Endkonzentration 1.0 mmol/l)

1 µg genomische DNS
(Placenta-DNS, Karpas 422-DNS, Patienten-DNS)

Ein AmpliWax PCR Gem 50 Wachskügelchen wurde mit einer sterilen Pinzette in das Eppendorf-Gefäß dazugegeben, der Reaktionsansatz auf 80° C erwärmt und auf Eis gestellt, so dass sich über der flüssigen Phase eine dünne Wachsschicht bildete. Anschließend wurden 0.5 µl Taq-Polymerase (entsprechend 2.5 IE) mit 3µl des PCR-Amplifikationspuffers auf die nun verhärtete Wachsschicht dazu pipettiert. Diese so genannte „Hot Start“ PCR-Technik verhindert zum einen Volumenschwankungen und damit Veränderungen der Konzentration der Versuchszusätze durch Verdunstung, zum anderen erlaubt es die Vermischung des Reaktionsansatzes mit der Taq-Polymerase erst ab einer Temperatur von 70-80° C. Dadurch wird eine unspezifische Primer-Hybridisierung und somit begünstigte Synthese von unspezifischen PCR-Produkten durch unerwünschte Primer Oligomerisierung, bzw. Primer Dimerisierung verhindert (Chou et al., 1992).

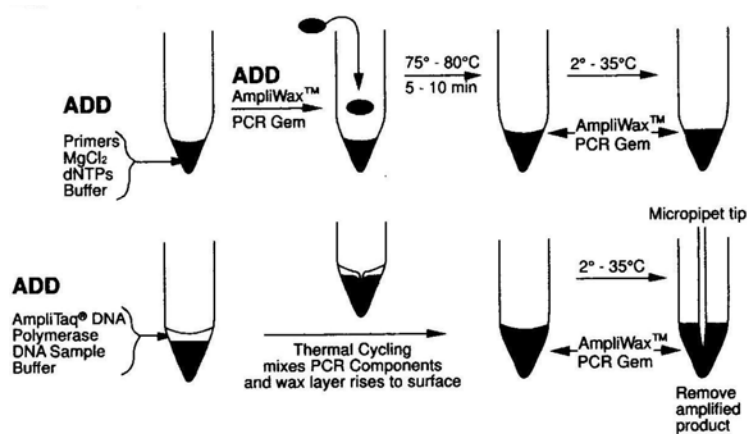


Abbildung 10: Die Hot Start PCR-Technik mit AmpliWax PCR Gem 50 Wachskügelchen

Die nachfolgend durchgeführte Standard-Amplifikation begann mit einer einmaligen 5 minütigen Denaturierungs-Vorlaufphase bei 94° C, dann folgten 35 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt über 1 Min. bei 94° C, einem Hybridisierungsschritt über 1 Min. bei 65° C und einem Syntheseschritt über 1.5 Min. bei 72° C. Beendet wurde die PCR mit einem abschließenden Syntheseschritt über 10 Min. bei 72° C.

| | | |
|--------------------------------|------|-----------|
| Denaturierungs-Vorlauf | 94°C | 1x5 Min. |
| | | |
| Denaturierung | 94°C | 1 Min. |
| Hybridisierung / Anlagerung | 65°C | 1 Min. |
| Synthese | 72°C | 1.5 Min. |
| | | |
| Programmlauf 35 Zyklen | | |
| | | |
| Abschließender Syntheseschritt | 72°C | 1x10 Min. |

Tabelle 12: PCR-Amplifikationsschritte

Zur Evaluierung der Spezifität der Reaktion und zum Ausschluss einer Kontamination wurde bei jedem PCR-Ansatz neben der Patienten DNS Placenta DNS als negative Kontrolle, DNS aus der Zelllinie Karpas 422 als positive Kontrolle und eine Reagenzienkontrolle mit allen Reagenzien ohne DNS sowohl auf die bcl-2/JH-Translokation als auch auf das nicht translozierte bcl-2 Allel mituntersucht.

2.5.4.2 Agarose Gelelektrophorese der PCR Amplifikate

Die gelelektrophoretische Visualisierung der PCR Amplifikate durch Agarose Gelelektrophorese und die Photodokumentation erfolgten analog der oben beschriebenen Auftrennung von DNS Restriktionsfragmenten im Kapitel Southern Blot Analyse genomischer DNS. Es wurden zusätzlich folgende Materialien eingesetzt:

DNS Molekulargewichtsmarker V, Boehringer M (Cat. No. 821705)
DNS Molekulargewichtsmarker VI, Boehringer M (Cat. No. 1062590)
DNS 100 Base Pair Ladder Marker, Pharmacia Biotech (Cat. No. 27-40001-01)

Die Auftrennung von PCR Amplifikaten von einer erwarteten Größe von 100 bis 500 bp erfolgte in einem 1.8 % igen, mit 0.5 µg/100 ml Ethidiumbromid getränktem Agarosegel, das mit je 15 µl der PCR Amplifikate und 5 µl Gelladepuffer („Loading Puffer“) beladen wurde. Die als Längenstandard verwendeten DNS Molekulargewichtsmarker V, VI und 100 Base Pair Ladder ergaben Fragmente folgender Basenpaargrößen:

DNS Molekulargewichtsmarker V:
587, 540, 504, 458 (+434), 267, 234, 213, 192 (+184), 124 (+123), 104, 89 (+80), 64 bp.

DNS Molekulargewichtsmarker VI:
2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 bp.

DNS 100 Base Pair Ladder: 100-2400 bp in 100 bp-Stufen.

Nach Auftrennung über 60 Min. in einem Spannungsfeld bei 80 Volt wurde das Gel mit einem Lineal als Längenstandard zur Dokumentation unter UV-Licht abphotographiert.

2.5.4.3 Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate

Zum verbesserten Nachweis der PCR Amplifikate und Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR Produkte durch Vakuum Blot analog der im Kapitel 2.5.3 beschriebenen Southern Blot Analyse der genomischen DNS auf Nylonmembranen übertragen, mit einer MBR (major breakpoint region) DNS-Sonde hybridisiert und durch Autoradiographie visualisiert.

Der alkalische Transfer der PCR Amplifikate auf eine Nylonmembran erfolgte analog der oben beschriebenen Southern Blot Analyse der genomischen DNS. Zusätzlich wurden folgende Materialien und Geräte herangezogen:

Nylon Membran (positive charged), Boehringer Mannheim (Cat. No. 1417240)

Das alkalische Transfervorgang auf positiv geladene Nylon Membranen ist die Methode der Wahl zum Vakuum Transfer von kurzen DNS Fragmenten wie PCR Amplifikate. Durch das alkalische Milieu während des gesamten Vakuumtransfers bleiben die DNS Amplifikate denaturiert, d. h. im Einzelstrangzustand. Dadurch wird eine Reassoziierung komplementärer Fragmente verhindert und der Blotvorgang, d. h. die Übertragung der DNS Amplifikate auf die Nylon Membran erleichtert.

Nach dem Vakuumtransfer in Denaturierungslösung (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) über 3 Stunden bei 40 mm H₂O Unterdruck erfolgte die Fixierung der PCR Amplifikate auf der Nylonmembran durch Backen über 30 Min. bei 120° C.

Die radioaktive Hybridisierung erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise bei der Southern Blot Analyse der genomischen DNS. Dazu wurde die bcl-2 DNS Probe, die JH DNS Probe oder das Oligonukleotid MBR-2 (Oncogene Science) als Gensonde herangezogen, welches auch als Primer für die interne bcl-2 Kontrollreaktion bei der PCR Amplifikation des nicht umgelagerten bcl-2 Allels eingesetzt wurde und dessen Sequenz komplementär zu der des bcl-2 Gens auf dem Chromosom 18q21.3 ist.

Die jeweilige DNS-Sonde bzw. das MBR-2 Oligonukleotid wurde nach der im Punkt 2.5.3 beschriebenen Random Priming Methode mit radioaktiven, mit 6000 Ci/mmol ³²P -markierten Nukleotiden [α -³²P] dATP und [α -³²P] dCTP hybridisiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über 12 Stunden bei 65° C im Hybridisierungsöfen unter kontinuierlichem langsamem Mischen durch Rotation.

Nach anschließendem Waschvorgang wurden die positiv geladenen Nylonmembranen in dünne Plastikfolien verpackt und in der Dunkelkammer zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-O Mat) zwischen zwei Verstärkerfolien zur Autoradiographie in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Bei regelrechtem Reaktionsablauf erschienen auf dem Röntgenfilm schwarze Banden an Stellen, an denen die radioaktiv markierte MBR-2 DNS Sonde an die entsprechenden Banden der spezifischen PCR Amplifikate auf der Nylonmembran binden konnte. Die Autoradiographie erfolgte bei Raumtemperatur entsprechend der Stärke der entstandenen Banden auf dem Röntgenfilm über 3 bis 12 Stunden.

Nach Auswertung und Dehybridisierung in Aqua dest. über 1 Stunde bei 65° C wurden die Nylonmembranen unter gleichen Bedingungen mit weiteren DNS-Sonden rehybridisiert.

Hybridisierte eine Bande des PCR Amplifikats sowohl mit dem MBR-2 Oligonukleotid bzw. der bcl-2 DNS Sonde als auch mit der JH DNS Sonde, konnte von einer bcl-2/JH-Translokation, t(14;18) im Bereich der MBR ausgegangen werden.

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Untersuchung der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion beim Nachweis der bcl-2 Translokation bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen durchgeführt.

Bei 34 von 35 Patienten wurde Knochenmarkpunktat, bei einem von 35 Patienten wurde eine EDTA-Blutprobe zur Untersuchung der bcl-2 Translokation herangezogen.

| | |
|--------------------|----|
| SBA / PCR | 35 |
| Knochenmarkpunktat | 34 |
| EDTA-Blutprobe | 1 |

Tabelle 13: Verwendetes Material für die SBA und PCR

3.1 Ergebnis der Southern Blot Analyse genomischer DNS

Bei 17 von 35 Patienten konnte die Southern Blot Analyse genomischer DNS erfolgreich durchgeführt werden. Bei 10 von 17 untersuchten Patienten (58.8%) konnte eine bcl-2 Translokation nachgewiesen werden, die restlichen 7 Patienten (41.2%) zeigten keine bcl-2/JH Translokation.

Bei 17 von 35 Patienten konnte keine Southern Blot Analyse der genomischen DNS durchgeführt werden, da die isolierte DNS-Menge für die Analyse nicht ausreichte.

Bei einem von 35 Patienten konnte das Ergebnis der Southern Blot Analyse der genomischen DNS nicht beurteilt werden, da die Bande sowohl auf dem Agarosegel als auch auf der Nylonmembran sowie auf dem Röntgenfilm eine Schmierschicht darstellte. Dieses Phänomen kann bei einer zu starken Verunreinigung der DNS, z. B. durch Proteine und Salze oder bei niedriger Qualität der DNS, z. B. durch Strangbrüche bei zu langem Enzymverdau oder nach erfolgter Chemotherapie beobachtet werden.

| | |
|-----------------------|------------|
| Southern Blot Analyse | |
| pos. | 10 (58.8%) |
| neg. | 7 (41.2%) |
| nicht beurteilbar | 1 |
| nicht durchgeführt | 17 |
| Gesamtzahl | 35 |

Tabelle 14: Ergebnis der Southern Blot Analyse genomischer DNS

3.1.1 Optimierung der Southern Blot Analyse genomischer DNS

Die Southern Blot Analyse genomischer DNS erfolgte nach bereits beschriebenen Standardmethoden (Southern, 1975, Ausubel FM et al., 1992; Sambrook J et al., 1989) und war in unserem hämatologischen Labor bereits etabliert.

3.1.2 Ergebnis der negativen und positiven Kontrollreaktionen der SBA

Die bei jedem Reaktionsansatz als negative Kontrolle verwendete Placenta DNS wies in jedem Versuchsdurchlauf bei allen drei Enzymverdauschritten die jeweils erwartete Keimbahnbande und keine zusätzliche oder veränderte Bande auf. Dieses Ergebnis bestätigte den regelrechten Ablauf aller Reaktionsschritte. Zusätzlich konnte die hohe Spezifität der Southern Blot Analyse bestätigt und eine Kontamination der Patienten DNS ausgeschlossen werden. Zudem konnte die hohe Sensitivität des Versuchsansatzes bestätigt werden. Der Einsatz von 10 µg Placenta DNS genügte für die deutliche Erkennung der Keimbahnbande auf dem Röntgenbild.

3.1.3 Ergebnis der SBA bei Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom

Von 18 Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom (CB NHL) wiesen 4 Patienten eine umgelagerte bcl-2 Bande auf (pos.), die mit der JH Bande komigrierte. 4 Patienten wiesen die Keimbahnbande auf (neg.). Bei einem Patienten war das Ergebnis wie weiter oben beschrieben nicht beurteilbar (n. b.). Bei 9 Patienten konnte die Southern Blot Analyse nicht durchgeführt werden (n. d.).

| | |
|--------------------|----|
| CB NHL | 18 |
| pos. | 4 |
| neg. | 4 |
| nicht beurteilbar | 1 |
| nicht durchgeführt | 9 |

Tabelle 15: Ergebnis der SBA bei CB NHL

3.1.4 Ergebnis der SBA bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom

Von 17 Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom (CB-CC NHL) wiesen 6 Patienten eine umgelagerte bcl-2 Bande auf, die mit der JH Bande komigrierte. 3 Patienten wiesen die Keimbahnbande auf. Bei 8 Patienten konnte die Southern Blot Analyse nicht durchgeführt werden.

| | |
|-----------|----|
| CB-CC NHL | 17 |
| pos. | 6 |
| neg. | 3 |
| n. d. | 8 |

Tabelle 16: Ergebnis der SBA bei CB-CC NHL

Bei der Patientenprobe OHJ (Initialen des Patienten) kam in der Gellaufsäule nach Enzymsspaltung mit ECO RI lediglich die Keimbahn-Bande (Germline, G) wie auch bei der Placenta-DNS auf der Nylon-Folie zur Darstellung. Die Größe des Fragments, das mit der MBR Sonde hybridisierte, betrug 5.2 bp. Die Größe des Fragments, das mit der JH Sonde hybridisierte, betrug 18 kb (Abbildung 11).

In den weiteren zwei Gellaufsäulen nach Enzymsspaltung mit BAM HI und HIND III konnte ebenfalls nur die Keimbahnbande und kein umgelagertes Allel dargestellt werden (nicht dargestellt).

Trotz des negativen Ergebnisses in der Southern Blot Analyse konnte bei dieser Patientenprobe in der PCR eine Umlagerung t(14;18) in MBR nachgewiesen werden (Abbildung 14, Abbildung 15).

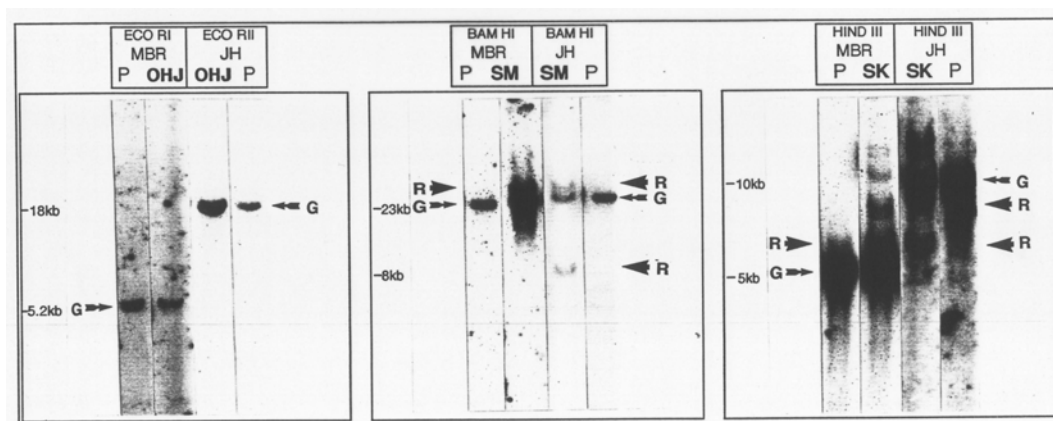


Abbildung 11: SBA bei Patientenproben OHJ, SM, SK.

R= Rearrangement, Umlagerung; G= Germline, Keimbahnbande

Bei der Patientenprobe SM konnte in der Gellaufsäule nach Enzymspaltung mit BAM HI neben der Keimbahnbande bei 23 kb sowohl in der Hybridisierung mit der MBR-Sonde als auch in der Hybridisierung mit der JH Sonde ein 25 kb großes Fragment dargestellt werden (Rearrangement, R). Diese sog. Kohybridisierung der beiden Sonden auf einem gleich langen Spaltprodukt belegt die Genumlagerung t(14;18). Das zweite Fragment von 8 kb Länge, das mit der JH Sonde hybridisierte zeigte keine Kohybridisierung (Abbildung 11).

Das positive Ergebnis in der Southern Blot Analyse konnte bei dieser Patientenprobe auch in der PCR i. S. einer Umlagerung t(14;18) in MBR bestätigt werden (Abbildung 14, Abbildung 15).

Bei der Patientenprobe SK konnte in der Gellaufsäule nach Enzymspaltung mit HIND III neben der Keimbahnbande bei 5 kb in der Hybridisierung mit der MBR-Sonde und bei 10 kb in der Hybridisierung mit der JH Sonde ein 6 kb großes Fragment dargestellt werden, das eine Kohybridisierung in den Gellaufsäulen beider Hybridisierungen zeigte und somit die Genumlagerung t(14;18) belegte. Das zweite Fragment von 9 kb Länge, das mit der JH Sonde hybridisierte zeigte keine Kohybridisierung (Abbildung 11).

Das positive Ergebnis in der Southern Blot Analyse konnte bei dieser Patientenprobe in der PCR nicht i. S. einer Umlagerung t(14;18) in MBR bestätigt werden (nicht dargestellt). Durch die Southern Blot Analyse konnte eine Umlagerung detektiert werden, die in der - auf eine bestimmte Bruchpunktregion begrenzte - Polymerase Kettenreaktion nicht nachweisbar war.

3.2 Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion

Bei allen 35 Patienten konnte die Polymerase Kettenreaktion erfolgreich durchgeführt werden. Bei 24 von 35 untersuchten Patienten (68.6%) konnte eine bcl-2 Translokation in der MBR (major breakpoint region) nachgewiesen werden, die restlichen 11 von 35 Patienten (31.4%) zeigten keine bcl-2 Translokation in MBR.

| | |
|------|-----------|
| PCR | 35 |
| pos. | 24 (68.6) |
| neg. | 11 (31.4) |

Tabelle 17: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion

3.2.1 Optimierung der PCR

Vor Durchführung der Polymerase Kettenreaktion an Patienten DNS wurden Versuchsreihen mit Placenta-DNS (Plac.) als negative Probe und Karpas 422-DNS als positive Probe (pos. P.) sowie ein Testlauf ohne DNS als negative Kontrolle (neg. K.) durchgeführt, um optimale Versuchsbedingungen für die Hot Start PCR Technik mit AmpliWax PCR Gem 50 Wachskügelchen zu ermitteln.

Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit MgCl₂-Konzentrationen von 0.75, 1.5 bis 2.25 mmol/l durchgeführt. Anschließend wurde die Anlagerungstemperatur für die Hybridisierung der Primer von 60, 62 und 65° C getestet.

Bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 1.5 mmol/l traten bei der Placenta DNS unspezifische Banden als Amplifikate mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 auf (Abbildung 12 und Tabelle 18, Probe 6). Das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 konnte das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens nicht amplifizieren, so dass keine Bande von 202 bp Länge im Agarosegel detektierbar war. Damit stand fest, dass die PCR unter dieser MgCl₂-Konzentration nicht korrekt ablief (Abbildung 12 und Tabelle 18, Probe 7).

Bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 2.25 mmol/l traten bei der Placenta DNS noch stärkere unspezifische Banden als Amplifikate mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 auf (Abbildung 12, Bande 8). Das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 konnte das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens ebenfalls nicht amplifizieren (Abbildung 12, Bande 9). Damit stand fest, dass die PCR unter dieser MgCl₂-Konzentration für unseren Versuchsaufbau auch nicht korrekt ablief.

Bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 0.5 mmol/l konnte bei der positiven Probe das Amplifikat von 200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel visualisiert werden, es traten keine unspezifischen Amplifikate auf (Abbildung 13 und Tabelle 19, Probe 8) (zu beachten ist die umgekehrte Reihenfolge der Proben 7 und 8 im Gel). Jedoch konnte bei dieser MgCl₂-Konzentration das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens weder bei der positiven Probe noch bei der Placenta DNS amplifizieren, so dass keine Bande von 202 bp Länge im Agarosegel detektierbar war. Damit stand fest, dass die PCR unter dieser MgCl₂-Konzentration ebenfalls nicht korrekt ablief (Abbildung 13 und Tabelle 19, Proben 2 und 7).

| Probe | 1 pos. P. | 2 pos. P. | 3 neg. K. | 4 Plac. | 5 Plac. | 6 Plac. | 7 Plac. | 8 Plac. | 9 Plac. |
|---|--------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Aqua dest [μ l] | 25.5 | 25.5 | 29.5 | 27 | 27 | 25.5 | 25.5 | 24 | 24 |
| Puffer [μ l] | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 |
| MgCl ₂ 25 mM Lsg. [μ l] | 3 | 3 | 3 | 1.5 | 1.5 | 3 | 3 | 4.5 | 4.5 |
| Konzentration [mmol/l] | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 0.75 | 0.75 | 1.5 | 1.5 | 2.25 | 2.25 |
| dNTP [μ l] | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Primer JH 1 [μ l] | 2 | | | 2 | | 2 | | 2 | |
| Primer MBR 1 [μ l] | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Primer MBR 3 [μ l] | | 2 | 2 | | 2 | | 2 | | 2 |
| Probe [μ l] | 4 | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Taq Polymerase [μ l] | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

Tabelle 18: PCR-Protokoll der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration mit Placenta-DNS

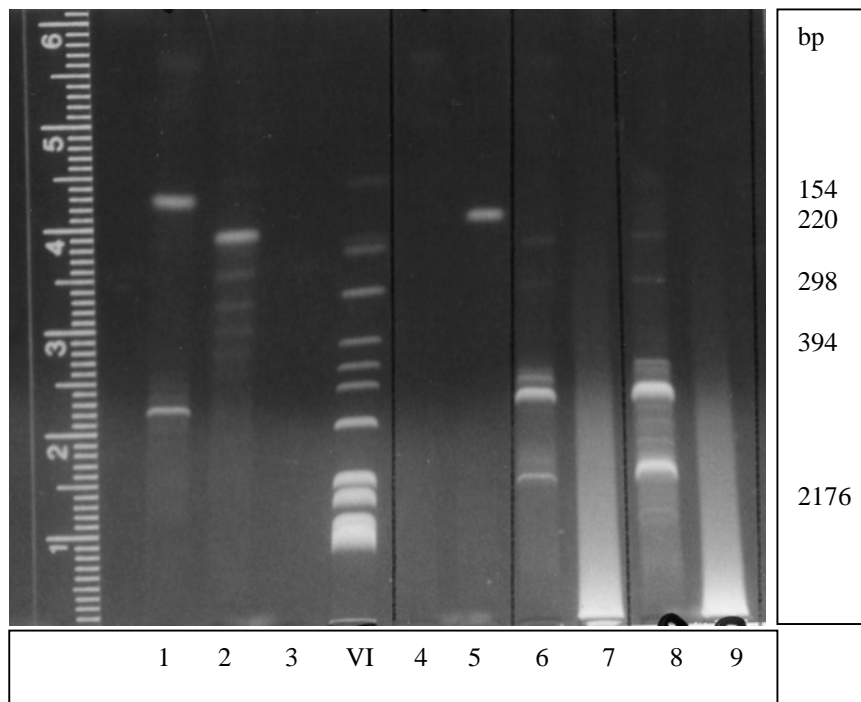


Abbildung 12: Gelelektrophorese der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration mit Placenta-DNS

| Probe | 1 Plac. | 2 Plac. | 3 Plac. | 4 Plac. | 5 Plac. | 6 Plac. | 7 pos. P. | 8 pos. P. | 9 pos. P. | 10 pos. P. | 11 pos. P. | 12 pos. P. |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Aqua dest [μ l] | 27.5 | 27.5 | 26.75 | 26.75 | 26 | 26 | 27.5 | 27.5 | 26.75 | 26.75 | 26 | 26 |
| Puffer [μ l] | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 | 2+3 |
| MgCl ₂ 25 mM Lösng. [μ l] | 1 | 1 | 1.75 | 1.75 | 2.5 | 2.5 | 1 | 1 | 1.75 | 1.75 | 2.5 | 2.5 |
| Konzentration [mmol/l] | 0.5 | 0.5 | 0.875 | 0.875 | 1.25 | 1.25 | 0.5 | 0.5 | 0.875 | 0.875 | 1.25 | 1.25 |
| dNTP [μ l] | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Primer JH 1 [μ l] | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| Primer MBR 1 [μ l] | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Primer MBR 3 [μ l] | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | | 2 |
| Probe [μ l] | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Taq Polymerase [μ l] | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

Tabelle 19: PCR-Protokoll der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration mit Placenta-DNS und positiver Probe

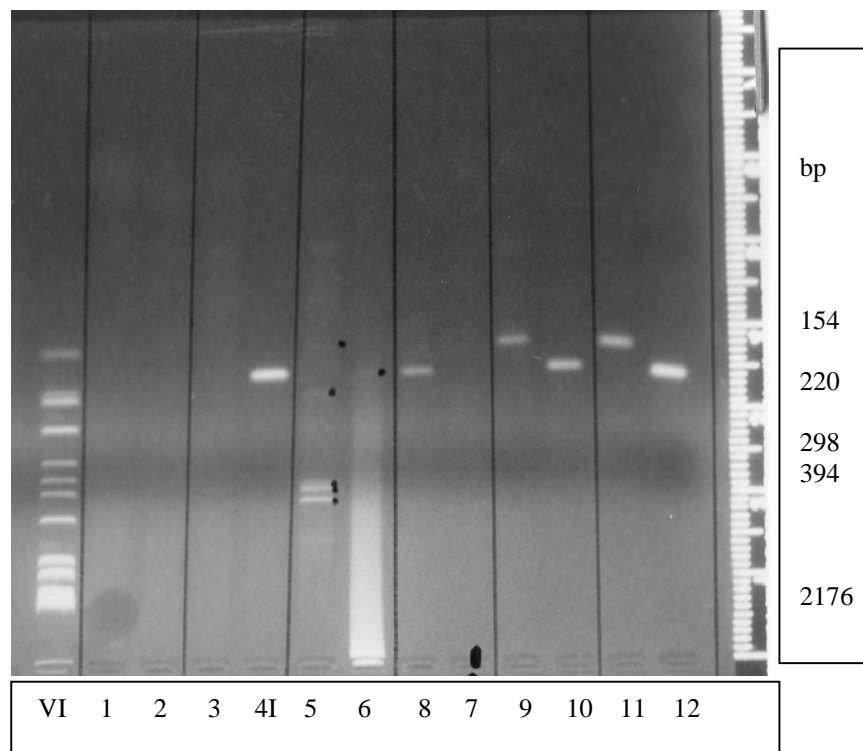


Abbildung 13: Gelelektrophorese der Versuchsreihe zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration mit Placenta-DNS und positiver Probe

Bei der Versuchsreihe zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur waren die Ergebnisse analog. Bei Temperaturen unter 62° C traten unspezifische Amplifikate auf. Bei Temperaturen über 62°C konnte das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens weder bei der positiven Probe noch bei der Placenta DNS amplifizieren.

Bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 1.0 mmol/l und bei einer Anlagerungstemperatur von 62° C ergab die Testreihe die optimalsten Ergebnisse, d. h. die geringsten unspezifischen Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR Amplifikate und Visualisierung unter der UV-Lampe. Bei der positiven Probe konnte das Amplifikat von 200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel visualisiert werden. Das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 konnte das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens sowohl bei der positiven Probe als auch bei der Placenta DNS amplifizieren. Die Probe ohne DNS (Reagenzien-Kontrolle) ergab kein Amplifikat (analog zu 0.75 mmol/l MgCl₂ in Abbildung 12, Bande 4 und 5, Tabelle 18, sowie zu 0.875 mmol/l MgCl₂ in Abbildung 13, Bande 3 und 4 + Bande 9 und 10; Tabelle 19).

3.2.2 Ergebnis der negativen und positiven PCR-Kontrollreaktionen

Ausgewertet wurden nur Versuchsanordnungen, bei denen folgende Bedingungen erfüllt wurden:

- In der Reagenzienkontrolle ohne DNS kam es nicht zu einer Amplifikation, eine Bande in der Gelelektrophorese kam nicht zur Darstellung.
- Das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 konnte das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens sowohl bei der positiven Probe als auch bei der Placenta DNS amplifizieren.
- Bei der positiven Probe konnte das Amplifikat von 200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel visualisiert werden.
- Die bei Patientenproben dargestellten Amplifikate hybridisierten so wie bei der positiven Kontrolle in der Southern Blot Analyse der PCR-Produkte mit den radioaktiv markierten Sonden.

Wurden diese Bedingungen nicht erfüllt, waren die Ergebnisse nicht auswertbar. Der Versuch wurde wiederholt.

Bei der positiven Probe konnte nach Optimierung der Versuchsbedingungen das Amplifikat von 200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel bei allen Versuchsdurchgängen visualisiert werden. Das zur Kontrolle eingesetzte Primerpaar MBR 1 und MBR 3 konnte das nicht umgelagerte Allel des bcl-2 Gens sowohl bei der positiven Probe als auch bei der Placenta DNS amplifizieren. Die Probe ohne DNS (Reagenzien-Kontrolle) ergab kein Amplifikat.

Bei den als zusätzliche negative Kontrolle eingesetzten Proben der Patienten mit T-Zell Non-Hodgkin Lymphom, centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom und Morbus Hodgkin ergab sich kein Amplifikat für die bcl-2 Translokation mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel.

3.2.3 Ergebnis der PCR bei Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom

Von 18 Patienten mit centroblastischem Non-Hodgkin Lymphom (CB NHL) konnte bei 13 Patienten (72.2%) ein Amplifikat von 100-200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel visualisiert und in der anschließenden Southern Blot Analyse der PCR-Produkte verifiziert werden (pos.); bei 5 Patienten (27.8%) konnte kein PCR Amplifikat dargestellt werden (neg.).

| | |
|--------|------------|
| CB NHL | 18 |
| pos. | 13 (72.2%) |
| neg. | 5 (27.8%) |

Tabelle 20: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion bei CB NHL

3.2.4 Ergebnis der PCR bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom

Von 17 Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin Lymphom (CB-CC NHL) konnte bei 11 (64.7%) Patienten ein Amplifikat von 100-200 bp Länge mit den Primerpaaren JH 1 und MBR 1 im Agarosegel visualisiert und in der anschließenden Southern Blot Analyse der PCR-Produkte verifiziert werden (pos.); bei 6 Patienten (35.3%) konnte kein PCR Amplifikat dargestellt werden (neg.).

| | |
|-----------|------------|
| CB-CC NHL | 17 |
| pos. | 11 (64.7%) |
| neg. | 6 (35.3%) |

Tabelle 21: Ergebnis der Polymerase Kettenreaktion bei CB-CC NHL

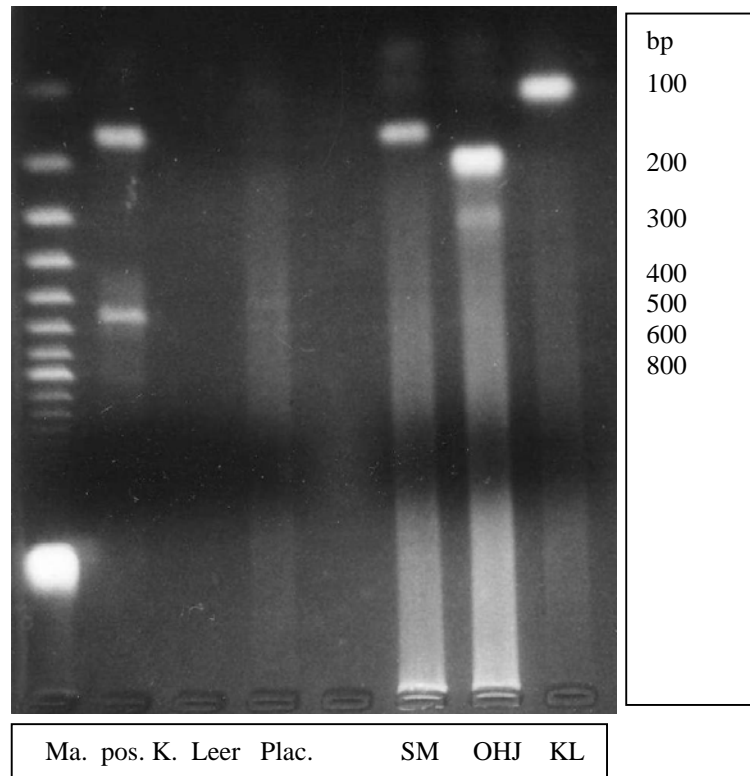


Abbildung 14: Agarosegel mit PCR Amplifikaten der Patientenproben SM, OHJ, KL

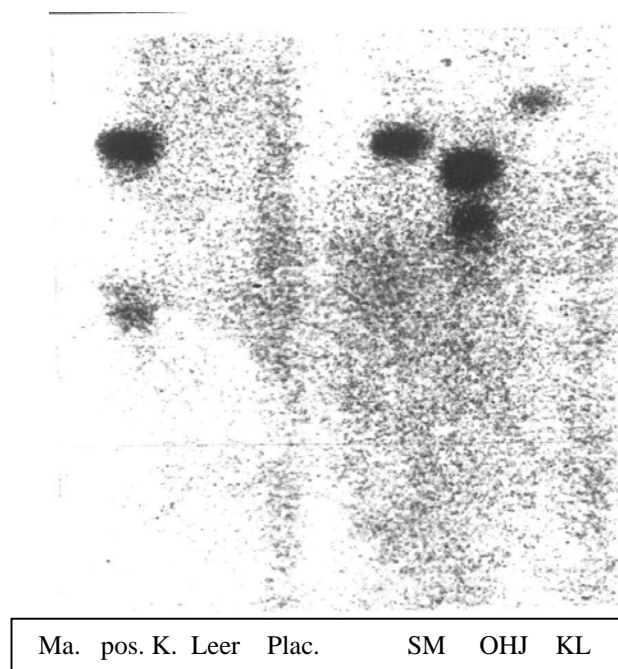


Abbildung 15: SBA der PCR Amplifikate der Patientenproben SM, OHJ, KL

Ma.=Molekulargewichtsmarker (Base Pair Ladder), pos. K.=positive Kontrolle (Karpas DNS), Plac.=negative Kontrolle (Placenta DNS). SM, OHJ, KL=Patientenproben (Initialen der Patienten)

PCR Amplifikate, die auf mit Ethidiumbromid getränkten Agarosegelen visualisiert wurden, zeigten nach Übertragung auf positiv geladene Nylon Membranen nach der Southern Blot Methode und Hybridisierung mit radioaktiven, mit 6000 Ci/mmol ³²P-markierten Nukleotiden [α -³²P] dATP und [α -³²P] dCTP mit der Gensonde MBR-2 (Oncogene Science) identische Banden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Amplifikaten tatsächlich um die Gensegmente der bcl-2 Translokation t(14;18) handelt.

Bei der Patientenprobe SM konnte in der Gelelektrophorese ein PCR Amplifikat von 150 bp Länge unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 14). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 15).

Das positive Ergebnis in der PCR konnte bei dieser Patientenprobe auch in der Southern Blot Analyse der genomischen DNS i. S. einer bcl-2 Umlagerung t(14;18) bestätigt werden (Abbildung 11).

Bei der Patientenprobe OHJ konnte in der Gelelektrophorese ein Amplifikat von 220 bp Länge unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 14). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 15). Zusätzlich konnte in der Gelelektrophorese ein Amplifikat von 300 bp Länge mit einer schwachen Bande dargestellt werden (Abbildung 14). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat ebenfalls in geringer Intensität mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 15).

Das positive Ergebnis in der PCR konnte bei dieser Patientenprobe in der Southern Blot Analyse der genomischen DNS nicht bestätigt werden, da am ehesten nicht genügend umgelagerte Zellen mit ausreichend umgelagerter DNS vorhanden waren (Abbildung 11).

Bei der Patientenprobe KL konnte in der Gelelektrophorese ein Amplifikat von 110 bp Länge unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 14). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat in geringer Intensität mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 15).

Bei dieser Patientenprobe konnte keine Southern Blot Analyse der genomischen DNS durchgeführt werden, da die vorhandene DNS-Menge für diese Analyse nicht ausreichte (s. Kapitel 5.1).

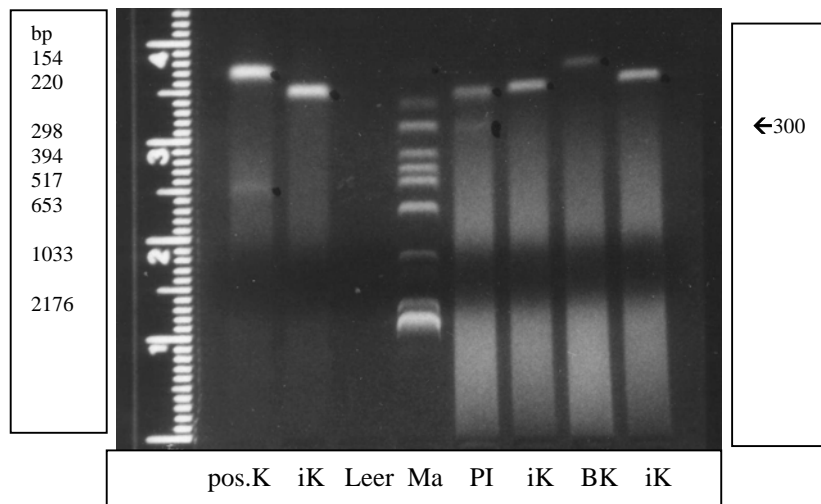


Abbildung 16: Ethidiumbromid getränktes Agarosegel mit PCR Amplifikaten der Patientenproben PI, BK

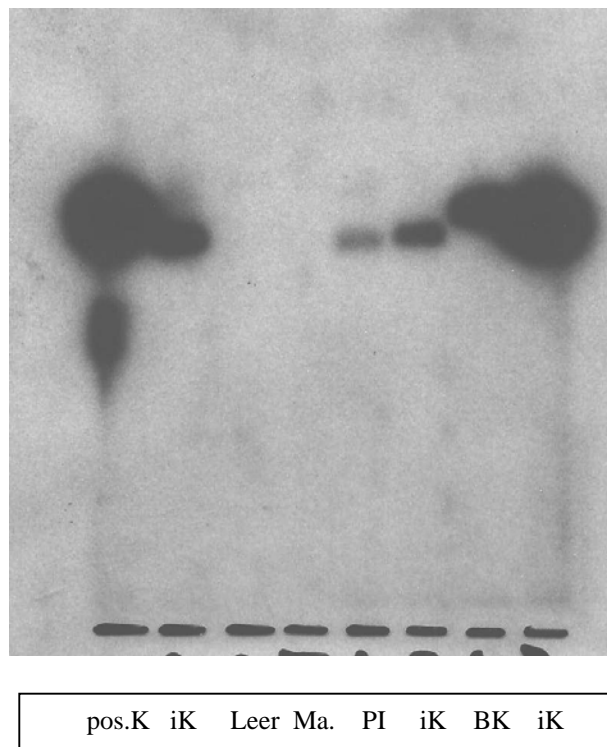


Abbildung 17: Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate der Patientenproben PI, BK
pos.K=positive Kontrolle (Karpas DNS), iK=interne Kontrolle (nicht umgelagertes bcl-2 Allel mit Primern MBR 1 und MBR 3), Leer=Leerkontrolle ohne DNS, Ma.=Molekulargewichtsmarker (Marker IV). PI, BK=Patientenproben (Initialen der Patienten)

Bei der Patientenprobe BK konnte in der Gelelektrophorese ein PCR Amplifikat von 170 bp Länge unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 16). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 17).

Bei dieser Patientenprobe war die Southern Blot Analyse der genomischen DNS nicht auswertbar, da beim Enzymverdau ein Schmierfilm entstand, der am ehesten auf DNS-Bruchstücke oder Verunreinigung zurückzuführen ist (s. Kapitel 5.1).

Bei der Patientenprobe PI konnte in der Gelelektrophorese ein PCR Amplifikat von 200 bp Länge unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 16). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 17). Zusätzlich konnte in der Gelelektrophorese ein Amplifikat von 300 bp Länge mit einer schwachen Bande dargestellt werden (Abbildung 16). In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte dieses Amplifikat nicht mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 17) (s. Kapitel 5.1).

Das positive Ergebnis in der PCR konnte bei dieser Patientenprobe auch in der Southern Blot Analyse der genomischen DNS i. S. einer bcl-2 Umlagerung t(14;18) bestätigt werden (nicht im Bild dargestellt).

3.3 Ergebnis der korrelativen Untersuchungen

Die erhobenen Befunde in der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion wurden im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen und klinischen Daten der Patienten bewertet.

3.3.1 Die Häufigkeit der bcl-2 Translokation

Bei 27 von 35 Patienten (77.1%) mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom in unserer Untersuchungsgruppe konnte die bcl-2 Translokation t(14;18) mit der Southern Blot Analyse (SBA) oder Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden (bcl-2 +). Bei 8 von 35 (22.9%) Patienten konnte keine bcl-2 Translokation mit beiden Methoden nachgewiesen werden (bcl-2 -).

| | |
|-------------|------------|
| SBA und PCR | 35 |
| bcl-2 + | 27 (77.1%) |
| bcl-2 - | 8 (22.9%) |

Tabelle 22: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR

Bei 10 von 17 beurteilbaren Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom (58.8%) konnte die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) nachgewiesen werden.

| | |
|-----------------|------------|
| SBA beurteilbar | 17 |
| pos. | 10 (58.8%) |
| neg. | 7 (41.2%) |

Tabelle 23: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA

Bei 24 von 35 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom (68.6%) konnte die bcl-2 Translokation mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden.

| | |
|------|------------|
| PCR | 35 |
| pos. | 24 (68.6%) |
| neg. | 11 (31.4%) |

Tabelle 24: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR

Die Häufigkeit der bcl-2 Translokation bei Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom in unserer Untersuchungsgruppe mit Patienten im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München ist vergleichbar mit der Häufigkeit, die in der Literatur für Patientengruppen in den USA, in Großbritannien und in den Niederlanden angegeben wird (Pezzella et al., 1990) (s. Kapitel 5.1).

3.3.2 Vergleich der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit herkömmlichen diagnostischen Untersuchungen

Zur Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der Southern Blot Analyse und Polymerase Kettenreaktion im Nachweis der bcl-2 Translokation t(14;18) im Vergleich zu herkömmlichen Nachweismethoden Cytologie (C), Histologie (H) und Immuncytologie (IC) zum Nachweis eines Befalls im Knochenmark sowie im peripheren Blut wurden die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit den klinischen Daten der Patienten verglichen.

Bei 29 von 35 Patienten (82.9%) mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom konnte ein peripherer Befall mit Lymphomzellen in mindestens einer der Untersuchungen in der Histologie, Cytologie oder Immuncytologie nachgewiesen werden. Darunter waren 28 von 35 Patienten mit Knochenmarksbefall (KM+).

Bei einem Patienten von 35 stand peripheres Blut statt Knochenmark als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Hier wurde immuncytologisch (Durchflusscytometrie im Hämato-Onkologischen Labor der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der LMU München) ein Befall mit Tumorzellen im Blut nachgewiesen (B+) (Patient MF, siehe auch Diskussion).

Dies entspricht einer Nachweisrate eines peripheren Befalls mit Lymphomzellen von 82.9%, wenn alle drei Nachweismethoden kombiniert angewendet wurden.

| | |
|---------------------|------------|
| Peripherer Befall ? | 35 |
| pos. | 29 (82.9%) |
| neg. | 6 (17.1%) |

Tabelle 25: Häufigkeit eines histologischen, cytologischen oder immuncytologischen Nachweises eines peripheren Befalls mit Lymphomzellen (KM+ / B+)

3.3.2.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)

Bei den o. g. 29 von 35 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein peripherer Befall im Knochenmark oder Blut cytologisch, histologisch oder immuncytologisch nachgewiesen worden war (KM+ / B+), werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der Southern Blot Analyse (SBA) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) verglichen.

3.3.2.1.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)

Bei 14 von 29 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein peripherer Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie nachgewiesen worden war (KM+ / B+), konnte die Southern Blot Analyse (SBA) durchgeführt werden. Bei einem von 29 Patienten war die SBA nicht beurteilbar (Pat. BK, s. Kapitel 5.1).

Bei 9 von diesen untersuchten 14 Patienten konnte die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 64.3%.

| | |
|--------------------|-----------|
| KM+ / B+ | 29 |
| SBA durchgeführt | 14 |
| pos. | 9 (64.3%) |
| neg. | 4 (28.6%) |
| nicht beurteilbar | 1 (7.1%) |
| nicht durchgeführt | 15 |

Tabelle 26: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)

3.3.2.1.2 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)

Bei einem von 4 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein peripherer Befall (Knochenmark oder Blut) weder in der Cytologie, Histologie noch in der Immuncytologie nachgewiesen worden war (KM- / B-), konnte in die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 25.0%.

Bei drei von diesen 6 Patienten war die SBA negativ, bei zwei Patienten wurde keine SBA durchgeführt (s. Kapitel 5.1).

| | |
|--------------------|-----------|
| KM-/B- | 6 |
| SBA durchgeführt | 4 |
| pos. | 1 (25.0%) |
| neg. | 3 (75.0%) |
| nicht durchgeführt | 2 |

Tabelle 27: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)

3.3.2.1.3 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)

Bei allen 29 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein peripherer Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie nachgewiesen worden war (KM+ / B+), konnte die Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden.

Bei 20 von 29 Patienten konnte die bcl-2 Translokation in MBR mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 69.0%.

| | |
|---------------|------------|
| PCR, KM+ / B+ | 29 |
| pos. | 20 (69.0%) |
| neg. | 9 (31.0%) |

Tabelle 28: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. mit peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM+ / B+)

3.3.2.1.4 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)

Bei 4 von 6 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein peripherer Befall (Knochenmark oder Blut) weder in der Cytologie, Histologie noch in der Immuncytologie nachgewiesen worden war (KM- / B-), konnte die bcl-2 Translokation mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 66.7%.

Bei zwei von diesen 6 Patienten war die PCR negativ (s. Kapitel 5.1).

| | |
|---------------|-----------|
| PCR, KM- / B- | 6 |
| pos. | 4 (66.7%) |
| neg. | 2 (33.3%) |

Tabelle 29: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. ohne peripherem Befall (Knochenmark oder Blut) in der Cytologie, Histologie oder Immuncytologie (KM- / B-)

3.3.2.2 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA und PCR bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)

Die histologische Untersuchung wird insbesondere zur Bestimmung der Prognose in den frühen Stadien der Erkrankung als fakultative Untersuchung in der Lymphom Diagnostik empfohlen. Patienten im Krankheitsstadium A und einem nodulären Knochenmarksbefall haben eine besonders gute Prognose (Nickenig et al., 2004).

Bei 16 von 34 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom konnte ein Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen histologisch nachgewiesen werden. Bei einem von 34 Patienten war die Knochenmarkshistologie nicht beurteilbar, bei einem von 34 Pat. wurde keine Knochenmarkshistologie durchgeführt. Ein Patient von 35 fiel aus dieser Gruppe heraus, da peripheres Blut als Probe vorlag (Patient MF, s. weiter oben). Dies entspricht einer Nachweisrate von 47.1% für die histologische Untersuchung des Knochenmarks.

Bei 16 von 34 Patienten bestand kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall in der Histologie.

| | |
|--|------------|
| Knochenmarksbefall ? | 34 |
| KMH positiv | 16 (47.1%) |
| KMH negativ | 16 (47.1%) |
| KMH nicht beurteilbar / nicht durchgeführt | 2 (5.8%) |
| KMH nicht durchführbar (Blut) | 1 |

Tabelle 30: Häufigkeit eines Nachweises eines Knochenmarksbefalls in der Histologie (KMH+)

3.3.2.2.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)

Bei 7 von 9 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein Knochenmarksbefall nachgewiesen worden war (KMH+), konnte die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 77.8%.

Bei 1 von 9 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein Knochenmarksbefall nachgewiesen worden war (KMH+), konnte die bcl-2 Translokation mit der SBA nicht nachgewiesen werden, bei 1 von 9 dieser Patienten war die SBA nicht beurteilbar.

Bei 7 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein Knochenmarksbefall nachgewiesen worden war (KMH+), konnte die Southern Blot Analyse (SBA) nicht durchgeführt werden, da zu wenig Material zur Verfügung stand.

| | |
|--------------------|-----------|
| SBA, KMH+ | 9 |
| pos. | 7 (77.8%) |
| neg. | 1 (11.1%) |
| nicht beurteilbar | 1 (11.1%) |
| nicht durchgeführt | 7 |

Tabelle 31: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)

3.3.2.2.2 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Patienten ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)

Bei 3 von 9 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen in der Histologie bestand (KMH-), konnte eine bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 33.3%.

Bei 6 von 9 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen in der Histologie bestand (KMH-), konnte die bcl-2 Translokation mit der SBA nicht nachgewiesen werden.

Bei 7 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen in der Histologie bestand (KMH-), konnte die Southern Blot Analyse (SBA) nicht durchgeführt werden, da zu wenig Material zur Verfügung stand.

| | |
|--------------------|-----------|
| KMH- | 16 |
| SBA durchgeführt | 9 |
| pos. | 3 (33.3%) |
| neg. | 6 (66.7%) |
| nicht durchgeführt | 7 |

Tabelle 32: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA bei Pat. ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)

3.3.2.2.3 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten mit Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH+)

Bei 11 von 16 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen ein Knochenmarksbefall histologisch oder immunocytoologisch nachgewiesen worden war (KM+), konnte die bcl-2 Translokation in MBR mit der PCR nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 68.8%.

| | |
|-----------|------------|
| PCR, KMH+ | 16 |
| pos. | 11 (68.8%) |
| neg. | 5 (31.2%) |

Tabelle 33: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. mit Knochenmarksbefall in der Histologie

3.3.2.2.4 Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Patienten ohne Knochenmarksbefall in der Histologie (KMH-)

Bei 11 von 16 Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom, bei denen kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen in der Histologie bestand (KMH-), konnte eine bcl-2 Translokation in MBR mit der PCR nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 68.8%.

Bei 5 von diesen 16 Patienten war die PCR negativ (s. Kapitel 5.1).

| | |
|-----------|------------|
| PCR, KMH- | 16 |
| pos. | 11 (68.8%) |
| neg. | 5 (31.2%) |

Tabelle 34: Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit PCR bei Pat. ohne Knochenmarksbefall in der Histologie

3.3.3 Vergleich der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen mit klinischen Verlaufsparemtern

Zur Untersuchung der Frage, ob die Tatsache, dass eine bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse (SBA) oder Polymerase Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen wurde eine Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung hat, wurde die Untersuchungsgruppe von 35 Patienten in eine Patientengruppe mit (bcl-2 +) und eine Patientengruppe ohne (bcl-2 -) Nachweis einer bcl-2 Translokation eingeteilt. Der klinische Beobachtungszeitraum lag im Durchschnitt bei 40.7 Monaten mit einer Varianz von 1 bis 212 Monaten. Aufgrund der großen Varianz des Beobachtungszeitraums und der Tatsache, dass die Therapie nicht bei allen Patienten einheitlich durchgeführt wurde, sind die folgenden Verlaufsdaten mit Einschränkung zu beurteilen.

3.3.3.1 Unterschiede bezüglich des Allgemeinzustands nach WHO

Der Allgemeinzustand nach WHO von 12 aller untersuchten 35 Patienten wurde in Stufe 0, von 7 Patienten in Stufe 1, von 12 Patienten in Stufe 2, von einem Patienten in Stufe 3 und von 4 Patienten in Stufe 4 eingeteilt.

Von den 12 Patienten mit Allgemeinzustand nach WHO in Stufe 0 waren 9 Patienten bcl-2 +, 3 Patienten bcl-2 -. Von den 7 Patienten mit Allgemeinzustand in Stufe 1 waren 6 Patienten bcl-2 +, 1 Patient bcl-2 -. Von den 12 Patienten mit Allgemeinzustand in Stufe 2 waren 10 Patienten bcl-2 +, 2 Patienten bcl-2 -. Der einzige Patient mit Allgemeinzustand in Stufe 3 war bcl-2 -. Von den 3 Patienten mit Allgemeinzustand in Stufe 4 waren 2 Patienten bcl-2 +, 1 Patient bcl-2 -.

| Allgemeinzustand | Gesamt | bcl-2 + | bcl-2 - |
|------------------|--------|---------|---------|
| Stufe 0 | 12 | 9 | 3 |
| Stufe 1 | 7 | 6 | 1 |
| Stufe 2 | 12 | 10 | 2 |
| Stufe 3 | 1 | 0 | 1 |
| Stufe 4 | 3 | 2 | 1 |
| Gesamtzahl | 35 | 27 | 8 |

Tabelle 35: Unterschiede bezüglich des Allgemeinzustands nach WHO

3.3.3.2 Unterschiede bezüglich des Überlebens zum Zeitpunkt der Auswertung

Von den untersuchten 35 Patienten lebten 24 Patienten bei Abschluss der Untersuchung, 3 waren vorzeitig aus der Beobachtungsgruppe ausgeschieden, 8 Patienten waren verstorben.

Von den 24 Patienten, die bei Abschluss der Untersuchung lebten, waren 19 Patienten bcl-2 +, 5 Patienten bcl-2 - (Prozentangaben s. Tabelle 38). Von den 3 Patienten, die bei Abschluss der Untersuchung vorzeitig aus der Beobachtungsgruppe ausgeschieden waren, waren 2 Patienten bcl-2 +, 1 Patient bcl-2 -. Von den 8 Patienten, die bei Abschluss der Untersuchung

verstorben waren, waren 6 Patienten bcl-2 +, 2 Patienten bcl-2 -.

| | Gesamt | bcl-2 + | bcl-2 - |
|-------------------------|--------|-------------|------------|
| lebend | 24 | 19 (79.2 %) | 5 (20.8 %) |
| vorzeitig ausgeschieden | 3 | 2 (66.7 %) | 1 (33.3 %) |
| verstorben | 8 | 6 (75.0 %) | 2 (25.0 %) |
| Gesamtzahl | 35 | 27 (77.1 %) | 8 (22.9 %) |

Tabelle 36: Unterschiede bezüglich des Überlebens zum Zeitpunkt der Auswertung

3.4 Molekulargenetische Verlaufsuntersuchung

Bei 7 der 35 Patienten wurde eine molekulargenetische Verlaufsuntersuchung durchgeführt. Dabei wurde bei allen 7 Patienten Knochenmark (KM), bei 2 von 7 Patienten Lymphknoten (LK) und bei einem von 7 Patienten Milz Biopsat (Mlz) als Material untersucht. Die Verlaufsuntersuchung wurde 02/1997 beendet.

| Init. | Mat. Entn. Dat. | bcl-2 | PCR | SB | Diagn. | Stad. | IC | C | H | per. B. | CTX | RTX | AZ |
|-------|-----------------|-------|-----|-------|--------|-------|-------|-------|-------|---------|-----|-----|----|
| GM | 05.09.1991 | p | p | n. d. | CB-CC | IV A | p | p | p | p | n | n | 1 |
| | 05.11.1993 | p | p | n. d. | | IV A | n. d. | n | p | p | j | n | 2 |
| HW | 10.12.1992 | p | p | n. d. | CB-CC | CR | p | n | n | p | j | j | 2 |
| | 12.11.1993 | n | n | n. d. | | IV B | n. b. | n | p | p | j | j | 1 |
| | 22.03.1994 | p | p | n. d. | | IV B | p | p | p | p | j | j | 2 |
| KL | LK 03.08.1993 | p | p | n. d. | CB | IV A | entf. | entf. | p | entf. | j | j | 2 |
| | 03.08.1993 | p | p | n. d. | | IV A | p | p | n. b. | p | j | j | 2 |
| PM | 13.07.1993 | p | p | p | CB-CC | IV A | p | p | p | p | n | n | 2 |
| | 13.01.1994 | n | n | n. d. | | CR | n | n | n | n | j | n | 0 |
| SE | 12.11.1993 | n | n | n. d. | CB-CC | IV A | p | p | p | p | j | n | 2 |
| | 01.02.1994 | p | p | n. d. | | IV A | p | p | n. b. | p | j | n | |
| SF | 13.02.1992 | p | p | p | CB | IV A | p | p | p | p | j | j | 2 |
| | LK 10.05.1994 | n | n | n. d. | | I A | entf. | entf. | p | entf. | j | n | 2 |
| WA | 29.01.1993 | n | n | n. d. | CB | IV B | | n | n | n | n | n | 0 |
| | Mlz 16.02.1993 | p | p | p | | IV A | entf. | entf. | p | p | n | n | 0 |

Tabelle 37: Molekulargenetische Verlaufsuntersuchung

Init.: Initialen der Patienten; **Mat.:** Material (Knochenmark bzw. Lymphknoten (LK) oder Milz (Mlz)); **bcl-2:** bcl-2 Translokation; **Diagn.:** Diagnose; **Stad.:** klinisches Stadium; **IC:** Immunocytolegie; **C:** Cytologie; **H:** Histologie (KM, LK oder Mlz); **per. B.:** peripherer Befall am Material (KM, LK oder Mlz); **CTX:** Chemotherapie; **RTX:** Bestrahlungstherapie/Radiatio; **AZ:** Allgemeinbefinden nach WHO; **p:** positiv; **n:** negativ; **n. d.:** nicht durchgeführt; **n. b.:** nicht beurteilbar; **entf.:** entfällt

Nachfolgend wird der klinische Verlauf der Erkrankung von 2 Patienten, die eine klinische komplette Remission hatten (CR) beispielhaft dargestellt.

Patient HW befand sich 08/1991 bei ED des CB-CC NHL im Stadium IB, bekam eine Strahlentherapie (RTX). 05/1992 kam es zum 1. Rezidiv nach initialer partieller Remission (PR) in klinischem Stadium IV B. Nach durchgeführter CTX nach Schema COPBLAM kam es im UZ 1 zur kompletten Remission (CR). 07/1993 kam es zum 2. Rezidiv im klin. Stadium IV B. Es wurde eine CTX nach IEV (UZ 2) und IMVP (UZ 3) durchgeführt, die zur PR führte. Nach einer autologen Stammzelltransplantation (STX) 05/1994 kam es zur CR. Zum Abschluss der Untersuchung 08/1995 bestand CR.

Die PCR war zum UZ 1 positiv, zum UZ 2 negativ, zum UZ 3 positiv. Die SBA wurde bei allen 3 UZ nicht durchgeführt, da zu wenig Material zur Verfügung stand.

Die Immuncytologie (IC) des Knochenmarks war zum UZ 1 positiv, wurde zum UZ 2 nicht durchgeführt, war zum UZ 3 positiv. Die Cytologie (C) war zum UZ 1 und UZ 2 negativ, zum UZ 3 positiv. Die Histologie war zum UZ 1 negativ, zum UZ 2 und UZ 3 positiv. Das Allgemeinbefinden nach WHO lag zum UZ 1 bei 2, zum UZ 2 bei 1, zum UZ 3 bei 2.

Zum UZ 1 mit klinisch kompletter Remission (CR) konnte ein Befall mit malignen Zellen im Knochenmark in der PCR und Immuncytologie nachgewiesen werden.

Zum UZ 2 nach CTX konnte sowohl in der PCR als auch in der Immuncytologie kein Nachweis von malignen Zellen im Knochenmark erfolgen, obwohl sowohl in der Cytologie als auch in der Histologie des Knochenmarks maligne Zellen nachgewiesen wurden.

Zum UZ 3 nach weiterer CTX gelang der Nachweis von malignen Zellen im Knochenmark durch alle 4 Untersuchungsmethoden (Tabelle 40).

Bei diesem Patienten war eine gute Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse zum Ergebnis der Immuncytologie, jedoch nicht zur Cytologie und Histologie bei allen 3 UZ feststellbar. Der fehlende Nachweis von malignen Zellen durch beide Methoden zum UZ 2 ist am ehesten auf die gesteigerte Störanfälligkeit beider Methoden durch Zellabbauprodukte und DNS-Fragmente nach CTX zurückzuführen.

Patient PM befand sich 06/1993 bei ED des CB-CC NHL im klinischen Stadium IV A (UZ 1). Es wurde eine CTX nach Schema COAEPP durchgeführt. Es kam zur CR (UZ 2). 02/1995 kam es zum 1. Rezidiv im Stadium III A. Nach erneuter CTX mit IEV wurde 08/1995 eine STX durchgeführt. Zum Abschluss der Untersuchung 08/1995 bestand CR.

Die PCR war zum UZ 1 positiv, zum UZ 2 negativ. Die SBA war zum UZ 1 positiv, wurde zum UZ 2 wegen ungenügender Menge an Probenmaterial nicht durchgeführt.

Die IC des Knochenmarks war zum UZ 1 positiv, zum UZ 2 negativ. Die Cytologie (C) war zum UZ 1 positiv, zum UZ 2 negativ. Die Histologie (H) war zum UZ 1 positiv, zum UZ 2 negativ. Das Allgemeinbefinden nach WHO (AZ) zum UZ 1 bei 2, zum UZ 2 bei 0.

Zum UZ 1 klinischen Stadium IV A gelang der Nachweis von malignen Zellen im Knochenmark durch alle 4 Untersuchungsmethoden.

Zum UZ 2 mit klinisch kompletter Remission (CR) konnte kein Befall mit malignen Zellen im Knochenmark durch alle 4 Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden (Tabelle 40).

Bei diesem Patienten war eine gute Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse zu den Ergebnissen der SBA (nur UZ 1), Immunzytologie, Cytologie und Histologie bei beiden UZ feststellbar.

4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Bei 27 von 35 Patienten mit CB-CC oder CB NHL in unserer Untersuchungsgruppe mit Patientenstamm im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München konnte die bcl-2 Translokation t(14;18) mit der Southern Blot Analyse oder der Polymerase Kettenreaktion nachgewiesen werden (bcl-2 +). Das entspricht einer Häufigkeit von 77.1%. Die restlichen 8 von 35 Patienten zeigten keine bcl-2 Translokation mit beiden Methoden (bcl-2 -).

Bei 10 von 17 Patienten konnte die bcl-2 Translokation mit der SBA nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 58.8%. Bei 17 von 35 Patienten wurde keine SBA durchgeführt.

Bei 24 von 35 Patienten konnte die bcl-2 Translokation mit der PCR nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 68.6%.

| | SBA / PCR | SBA | PCR |
|------------|------------|------------|------------|
| bcl-2 + | 27 (77.1%) | 10 (58.8%) | 24 (68.6%) |
| bcl-2 - | 8 (22.9%) | 7 (41.2%) | 11 (31.4%) |
| Gesamtzahl | 35 | 17 | 35 |

Tabelle 38: Zusammenfassung der Häufigkeit der bcl-2 Translokation mit SBA / PCR

Bei 29 von 35 Patienten mit CB-CC oder CB NHL konnte ein peripherer Befall mit Lymphomzellen in mindestens einer der Untersuchungen in der Histologie, Cytologie oder Immunzytologie nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisrate von 82.9%, wenn alle drei Nachweismethoden kombiniert angewendet wurden.

Darunter waren 28 von 35 Patienten mit Knochenmarksbefall (KM+). Bei einem Patienten von 35 wurde EDTA-Blut statt Knochenmark als Untersuchungsmaterial verwendet. Hier wurde in der Immunzytologie ein Befall mit Tumorzellen im Blut nachgewiesen (B+).

Bei 16 von 34 Patienten mit CB-CC oder CB NHL konnte ein Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen histologisch nachgewiesen werden. Bei einem von 34 Patienten war die Knochenmarkshistologie nicht beurteilbar, bei einem von 34 Pat. wurde keine Knochenmarkshistologie durchgeführt. Ein Patient von 35 fiel aus dieser Gruppe heraus, da peripheres Blut als Probe vorlag. Dies entspricht einer Nachweisrate von 47.1% für die histologische Untersuchung des Knochenmarks.

Bei 16 von 34 Patienten bestand kein Hinweis auf einen Knochenmarksbefall in der Histologie.

| | IC / C / H | H |
|--|------------|------------|
| Peripherer Befall + | 29 (82.9%) | 16 (47.1%) |
| Peripherer Befall - | 6 (17.1%) | 16 (47.1%) |
| nicht beurteilbar / nicht durchgeführt | | 2 (5.8%) |
| Gesamtzahl | 35 | 34 |

Tabelle 39: Zusammenfassung der Häufigkeit des Nachweises eines peripheren Befalls durch IC, C, H

5 DISKUSSION

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Kritische Betrachtung der Southern Blot Analyse

Die Detektionsrate der Southern Blot Analyse liegt etwa bei einem Anteil von 5 bis 10 malignen Zellen unter 100 normalen Zellen (Benitez et al., 1992). Je höher der Anteil der malignen Zellen, die die Umlagerung t(14;18) tragen, an der Gesamtzahl der Zellen im Knochenmarksaspirat ist, umso größer ist die Detektions-Wahrscheinlichkeit in der SBA.

Die Methode kann nicht nur zur Diagnostik der Erkrankung durch den Nachweis klonaler Umlagerungen, sondern auch zur Verlaufskontrolle mit Detektion einer Subklonbildung, zur Untersuchung des Grades der Verdrängung des gesunden Zellbildes oder zur Bestimmung des Ausmaßes der Tumorzellreduktion herangezogen werden (Christgau, 1995).

Die Detektions-Wahrscheinlichkeit nimmt jedoch ab, wenn der Anteil der malignen Zellen im Knochenmark weniger als 5% beträgt.

Zur Erhöhung der Sensitivität der Southern Blot Analyse wurde in unserem Versuchsansatz der Restriktionsenzym-Verdauprozess der genomischen DNS mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Dadurch stiegen jedoch auch der Zeit- und Materialaufwand für die Untersuchung.

Für die SBA wird eine Mindestmenge an DNS, in der Regel 10 µg pro Restriktionsenzym-Verdauprozess, benötigt. Bei 3 Enzymverdau-Ansätzen entspricht dies einer DNS Menge von mindestens 30 µg. Steht eine geringe Menge an DNS zur Verfügung, kann die SBA nicht durchgeführt werden.

Bei der Patientenprobe KL konnte in der PCR ein Amplifikat von 110 bp Länge dargestellt werden. Bei dieser Patientenprobe konnte keine Southern Blot Analyse der genomischen DNS durchgeführt werden, da die aus dem Knochenmarksaspirat isolierte DNS-Menge für diese Analyse nicht ausreichte.

Bei dem Patienten MF stand peripheres Blut statt Knochenmark als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Es wurde immunzytologisch (Durchflusszytometrie) ein Befall mit Tumorzellen im Blut nachgewiesen. Bei dieser Patientenprobe konnte in der erfolgreich durchgeführten PCR kein Amplifikat dargestellt werden. Hier konnte ebenfalls keine Southern Blot Analyse der genomischen DNS durchgeführt werden, da die vorhandene DNS-Menge für diese Analyse nicht ausreichte.

Kommt es zu einem unvollständigen Enzymverdau durch Restriktionsenzyme, können in der Southern Blot Analyse zusätzliche Banden im Röntgenfilm entstehen, die wie umgelagerte Banden aussehen. Die Verwendung von 3 verschiedenen Restriktionsenzymen in unserem Versuchsansatz, um diese Fehlerquelle zu beheben ist mit höherem Zeit- und Materialaufwand, somit auch mit höheren Kosten verbunden. Bei Verunreinigung der DNS, z.B. durch Proteine und Salze sowie durch Strangbrüche bei zu langem Enzymverdau oder nach erfolgter Chemotherapie, kann die Analyse ebenfalls beeinträchtigt werden, so dass sowohl auf dem Agarosegel als auch auf der Nylonmembran sowie auf dem Röntgenfilm eine Schmierschicht entsteht. Dadurch ist keine Auswertung der Analyse möglich.

Bei der Patientenprobe BK konnte in der PCR ein Amplifikat von 170 bp Länge dargestellt werden. Bei dieser Patientenprobe war die Southern Blot Analyse der genomischen DNS nicht auswertbar, da beim Enzymverdau wie oben beschrieben eine Schmierschicht entstand. Nach der Hybridisierung und Autoradiographie waren weder die Keimbahnbande, noch umgelagerte Banden zu erkennen.

Die Southern Blot Analyse der genomischen DNS erfordert einen hohen Zeitaufwand. Durchschnittlich dauerte es in unserem Versuchsansatz 7 Tage, bis das Ergebnis vorlag. Bei einzelnen Proben mit geringer Strahlungsintensität bei der Autoradiographie lag die Expositionsdauer der Röntgenfilme über 14 Tage.

Aus diesen genannten Gründen konnte nur bei 17 von 35 Patienten die Southern Blot Analyse genomischer DNS erfolgreich durchgeführt werden; bei 17 von 35 Patienten konnte keine SBA durchgeführt werden, da die isolierte DNS-Menge für die Analyse nicht ausreichte; bei einem von 35 Patienten konnte das Ergebnis der SBA nicht beurteilt werden.

Durch die Southern Blot Analyse der genomischen DNS kann die bcl-2 Translokation t(14;18) im Vergleich zur Polymerase Kettenreaktion unabhängig von der Kenntnis der genauen Bruchpunktregion der bcl-2 Translokation t(14;18) nachgewiesen werden. Steht DNS aus einer genügenden Anzahl maligner Zellen, die die Umlagerung tragen zur Verfügung, ist die Sensitivität und Spezifität der Methode theoretisch größer als bei der PCR. Bei 3 von 17 Patientenproben (17.6%) mit negativer PCR gelang ein Nachweis der Translokation t(14;18) in der SBA. Der für jeden Patienten individuelle genaue Bruchpunktort kann mit der SBA nicht wie bei der PCR nachgewiesen werden, dagegen können aber auch Bruchpunkte auf der DNA erfasst werden, die außerhalb des Amplifikationsabschnittes der PCR liegen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Southern Blot Analyse der genomischen DNS im Nachweis der Translokation t(14;18) eine sensitive und hochspezifische, jedoch zeit- und kostenintensive Methode ist. Daher ist die SBA weniger für Routinediagnostik geeignet als die PCR.

5.1.2 Kritische Betrachtung der Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist in der Lage, eine maligne Zelle unter 10^6 Zellen zu detektieren (Lee, 1993). Die Methode ist schnell und kostengünstig. In unserem Versuchsansatz lag das Ergebnis im Durchschnitt innerhalb eines Tages vor.

Im Versuchsansatz wurde 1 µg genomische DNS eingesetzt, welche einer DNS-Menge von ca. 10^4 Zellen entspricht. Durch eine Verdünnungsreihe der positiven Probe konnte mit 9 ng DNS ein Amplifikat im Agarosegel dargestellt werden, was etwa einer Detektionsrate von einer malignen Zelle unter 10^6 Zellen entspricht.

Bei allen der untersuchten 35 Patientenproben konnte die PCR erfolgreich durchgeführt werden. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der Polymerase Kettenreaktion wurde eine Southern Blot Analyse der PCR Produkte durchgeführt.

| | SBA/PCR + | SBA/PCR - | n. d. |
|-------|------------|-----------|-----------|
| PCR + | 12 (34.3%) | 0 | 6 (17.1%) |
| PCR - | 6 (17.1%) | 7 (20.0%) | 4 (11.4%) |

Tabelle 40: Mehrfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA/PCR

Bei 6 von 35 Patienten (17.1%), bei denen in der Gelelektrophorese der PCR Amplifikate keine Bande detektierbar war, konnte in der Southern Blot Analyse der PCR Produkte doch noch eine Bande dargestellt und somit die Sensitivität gesteigert werden. Andernfalls wäre die PCR als negativ beurteilt worden.

Bei 12 von 35 Patienten (34.3%) wurde das positive, bei 7 von 35 Patienten (20.0%) das negative PCR Ergebnis in der Southern Blot Analyse der PCR Produkte bestätigt. Bei keinem der 35 Patienten war die Southern Blot Analyse der PCR Produkte negativ, wenn in der Gelelektrophorese der PCR Amplifikate eine Bande detektierbar war. Dies spricht für die hohe Spezifität der Southern Blot Analyse der PCR Produkte.

Bei 6 PCR positiven und 4 PCR negativen Patienten wurde die Southern Blot Analyse der PCR Produkte nicht durchgeführt. Unter den 4 PCR negativen Patienten, bei denen die Southern Blot Analyse der PCR Produkte nicht durchgeführt wurde, konnte bei 3 Patienten ebenfalls keine Southern Blot Analyse der genomischen DNS durchgeführt werden; bei einem von diesen Patienten konnte in der Southern Blot Analyse der genomischen DNS eine bcl-2 Translokation nachgewiesen werden (Pat. SPP).

Dies unterstreicht zusätzlich den hohen Stellenwert der Southern Blot Analyse der PCR Produkte, weswegen sie zur Sicherung der Ergebnisse als Standardmethode empfohlen werden kann.

Die Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für die jeweiligen Primerpaare zeigte sich als unabdingbar, da insbesondere geringe Unterschiede der Anlagerungstemperatur und der MgCl₂-Konzentration die Sensitivität der PCR beeinflussen können, z. B. zur Bildung von Primer-Dimeren führen können (Berinstein et al., 1993, Chou et al., 1992). In unserer Versuchsreihe wurde eine optimale Anlagerungstemperatur von 62°C und eine MgCl₂-Konzentration von 1.0 mmol/l ermittelt, die geringfügig von den Empfehlungen des Herstellers für die jeweiligen Primerpaare abwich (Anlagerungstemperatur 65°C, MgCl₂-Konzentration 1.5 mmol/l). Bei Nichteinhalten der optimierten Bedingungen entstanden viele unspezifische Banden im Agarosegel bei der Visualisierung unter UV-Licht.

Unter anderem können die Konzentration des Agarosegels, die Menge der in der Reaktion eingesetzten Patienten-DNS, die Betriebsart des Thermocycler-Gerätes (Metallträger- oder Wasserbad-Technik) mit unterschiedlicher Wärmeleitung an die Röhren, die Konzentration der Nukleotide in der Lösung, Verwendung von Mineralöl oder Wachs als

Verdunstungsschutz über der Reaktionslösung den Reaktionsablauf beeinflussen. An der Vielzahl der möglichen Störfaktoren liegt auch die Hauptproblematik bei der Polymerase Kettenreaktion mit zum Teil hohem Zeit- und Kostenaufwand bis zur Optimierung der Versuchsbedingungen. Dies machte in unserer Versuchsreihe die mehrfache Untersuchung der meisten Proben notwendig, um die Ergebnisse zu sichern.

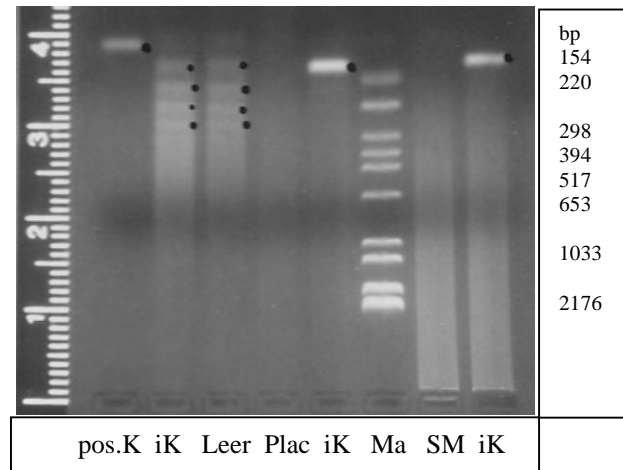


Abbildung 18: Ethidiumbromid getränktes Agarosegel mit PCR Amplifikaten: pos. Kontrolle, Placenta, Patientenprobe SM

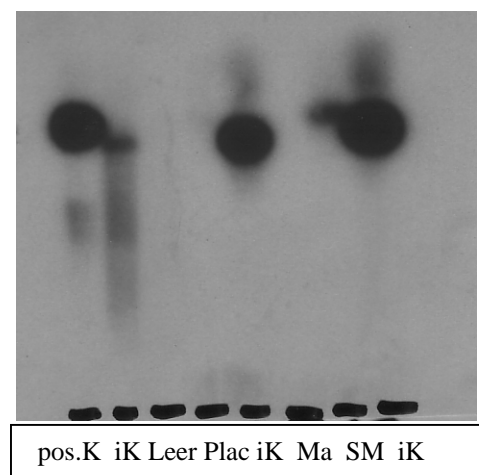


Abbildung 19: Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate: pos. Kontrolle, Placenta, Patientenprobe SM

pos.K= positive Kontrolle (Karpas DNS), iK= interne Kontrolle (nicht umgelagertes bcl-2 Allel mit Primern MBR 1 und MBR 3), Leer= Leerkontrolle ohne DNS, Ma.= Molekulargewichtsmarker (Marker IV). SM= Patientenprobe (Initialen d. Patienten)

Beim Versuchsansatz mit einer Anlagerungstemperatur von 62°C und einer MgCl₂-Konzentration von 15 mM entstanden nach Wechsel des Thermocycler-Gerätes von einem Gerät mit Wasserbad-Technik auf ein Gerät mit Metallträger der Fa. Perkin Elmer Cetus bei der internen Kontrolle und Leerkontrolle ohne DNS auf dem Agarosegel unspezifische Banden, bei der Patientenprobe SM konnte in der Gelelektrophorese kein PCR Amplifikat unter UV-Licht dargestellt werden (Abbildung 18).

In der Southern Blot Analyse der PCR Produkte hybridisierte eine Bande bei der internen Kontrolle, keine Bande der Leerkontrolle, eine Bande bei der Patientenprobe SM von 150 bp Länge mit der MBR-2 Gensonde (Abbildung 19).

Das positive Ergebnis in der Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate konnte bei dieser Patientenprobe auch in der Southern Blot Analyse der genomischen DNS i. S. einer bcl-2 Umlagerung t(14;18) bestätigt werden (nicht im Bild dargestellt).

Dies verdeutlicht die Störanfälligkeit der Polymerase Kettenreaktion und die Notwendigkeit, die Ergebnisse durch die Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate zu sichern, um dadurch die Sensitivität und Spezifität der PCR zu erhöhen.

5.1.3 Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA

Horsman et al., 1995 untersuchten die Sensitivität und Spezifität der Polymerase Kettenreaktion und Southern Blot Analyse bei Patienten mit follikulären Non-Hodgkin Lymphomen, bei denen die Translokation t(14;18) cytogenetisch an Hand einer Chromosomenanalyse nachgewiesen worden war. 78 von 104 Patienten (75%) zeigten in der SBA, 68 von 104 Patienten (65%) zeigten in der PCR (MBR oder MCR) eine Umlagerung.

Da in unserem Patientengut keine cytogenetische Untersuchung durchgeführt wurde, die eine Translokation t(14;18) nachweist, sondern Cytologie, Immuncytologie und Knochenmarkhistologie mit Untersuchung auf einen Befall mit malignen Lymphomzellen im Blut oder Knochenmark ungeachtet der bcl-2 Translokation, fehlte uns ein Referenzwert zur korrekten Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der Polymerase Kettenreaktion und der Southern Blot Analyse. Einschränkend kommt hinzu, dass die Southern Blot Analyse nur bei 17 von 35 Patientenproben durchgeführt bzw. ausgewertet werden konnte.

Betrachtet man die Patientenproben mit nachgewiesenem Befall durch maligne Lymphomzellen in der Knochenmarkshistologie, zeigten in unserer Untersuchung 7 von 9 Patienten in der Southern Blot Analyse eine Umlagerung (77.8%) und 11 von 16 Patienten in der PCR eine Umlagerung (68.8%). Diese Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung zu denjenigen von Horsman et al., 1995 (s. Kapitel 3.3.2.2.1 und 3.3.2.2.3).

Im folgenden Abschnitt wird daher ein gegenseitiger Vergleich der beiden Methoden untereinander durchgeführt, wodurch nur eine eingeschränkte Aussage möglich ist.

| | PCR + | PCR - | n. d. | n. b. |
|-------|------------|-----------|-------|-------|
| SBA + | 7 (20.0%) | 3 (8.6%) | | |
| SBA - | 5 (14.3%) | 2 (5.7%) | | |
| n. d. | 11 (31.4%) | 6 (17.1%) | | |
| n. b. | 1 (2.9%) | | | |

Tabelle 41: Mehrfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA

(Gesamtzahl der Patientenproben); n. d.: nicht durchgeführt, n. b.: nicht beurteilbar

Die bcl-2 Translokation t(14;18) konnte mit der Southern Blot Analyse bei 58.8%, mit der Polymerase Kettenreaktion bei 68.6% der mit der jeweiligen Methode untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Wurden beide Methoden kombiniert angewendet, betrug die Nachweisrate 77.1% (Tabelle 23, Tabelle 24).

Bei 17 von 35 Patientenproben, bei denen die SBA nicht durchgeführt werden konnte waren 11 (31.4%) in der PCR positiv und 6 (17.1%) in der PCR negativ (bezogen auf die Gesamtzahl der Patienten).

Bei einer von 35 Patientenproben, bei der die SBA nicht beurteilbar, war fiel die PCR positiv aus (2.9%).

Betrachtet man nur die 17 Patienten, bei denen die SBA beurteilbar war für sich, kommt man auf folgendes Ergebnis:

| | PCR + | PCR - |
|-------|-----------|-----------|
| SBA + | 7 (41.2%) | 3 (17.6%) |
| SBA - | 5 (29.4%) | 2 (11.8%) |

Tabelle 42: Vierfeldertafel zur Beurteilung der Sensitivität und Spezifität von PCR und SBA

(17 Patientenproben mit beurteilbarer SBA)

Bei 7 von 17 (41.2%) Patientenproben, bei denen die SBA positiv ausfiel war die PCR positiv und bei 3 von 17 (17.6%) war die PCR negativ.

Bei 5 von 17 (29.4%) Patientenproben, bei denen die SBA negativ ausfiel war die PCR positiv und bei 2 von 17 (11.8%) war die PCR negativ.

Umgekehrt lässt sich feststellen, dass bei 3 von 17 Patientenproben (17.6%) mit negativer PCR ein Nachweis der Translokation t(14;18) in der SBA gelang; dagegen gelang bei 5 von 17 Patientenproben (29.4%) mit negativer SBA ein Nachweis in der PCR.

Daraus lässt sich schließen, dass beide Methoden ihre Grenzen der Sensitivität und Spezifität im Nachweis der Translokation t(14;18) haben. Bei 29.4% der PCR positiven Patientenproben entging der SBA der Nachweis, bei 17.6% der SBA positiven Patientenproben entging der PCR der Nachweis der Translokation t(14;18). Daher sollten beide Methoden kombiniert angewendet werden, um falsch negative Resultate zu vermeiden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Häufigkeit der bcl-2 Translokation in der untersuchten Patientengruppe

Die Häufigkeit der bcl-2 Translokation t(14;18) bei Patienten mit centrocytisch-centroblastischem oder centroblastischem Non-Hodgkin-Lymphom in unserer

Untersuchungsgruppe mit 35 Patienten im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München ist mit 77.1% für PCR und SBA kombiniert vergleichbar mit der Häufigkeit, die in der Literatur für Patientengruppen in den USA, in Großbritannien und in den Niederlanden angegeben wird (Pezzella et al., 1990).

Die bcl-2 Translokation konnte mit der Southern Blot Analyse bei 58.8%, mit der Polymerase Kettenreaktion bei 68.6% der mit der jeweiligen Methode untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

Wurden beide molekulargenetischen Methoden kombiniert, konnte eine Nachweisquote von 77.1% für die bcl-2 Translokation t(14;18) erreicht werden.

Die Southern Blot Analyse der genomischen DNS kann die bcl-2 Translokation t(14;18) unabhängig von der Bruchpunktregion erfassen. Die Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate erhöht die Sensitivität und Spezifität der PCR. Aufgrund der Tatsache, dass in unserer Untersuchung nicht bei allen Patientenproben die Southern Blot Analyse der genomischen DNS und die Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate durchgeführt wurden und bei der PCR nur die Primerpaare für die MBR-Region eingesetzt wurden, ist von einer noch höheren Häufigkeit der bcl-2 Translokation t(14;18) auszugehen.

Beim Vergleich der molekulargenetischen Untersuchungsmethoden SBA und PCR mit morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immuncytologie ist zu beachten, dass die morphologischen Untersuchungsmethoden nicht die Translokation t(14;18), erfassen.

Bei 29 der 35 Patienten mit CB-CC oder CB NHL konnte ein peripherer Befall mit Lymphomzellen in mindestens einer der morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie oder Immuncytologie nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisrate von 82.9%, wenn alle drei Nachweismethoden kombiniert angewendet wurden (Tabelle 25).

Bei 16 von 34 Patienten mit CB-CC oder CB NHL konnte ein Knochenmarksbefall durch Lymphomzellen histologisch nachgewiesen werden. Bei einem von 34 Patienten war die Knochenmarkshistologie nicht beurteilbar, bei einem von 34 Pat. wurde keine Knochenmarkshistologie durchgeführt. Ein Patient von 35 fiel aus dieser Gruppe heraus, da peripheres Blut als Probe vorlag. Dies entspricht einer Nachweisrate von 47.1% für die alleinige histologische Untersuchung des Knochenmarks (Tabelle 30).

Die kombinierte Anwendung der morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immuncytologie erhöhte bei unserer Untersuchungsgruppe die Detektionsrate eines Befalls mit malignen Zellen im Knochenmark auf 82.9% im Vergleich zur Detektionsrate der Histologie allein von 47.1%. Daher sollten Histologie, Cytologie und Immuncytologie kombiniert angewendet werden um einen peripheren Befall mit Lymphomzellen zu detektieren.

Wird der Nachweis eines peripheren Befalls mit malignen Zellen als Kriterium herangezogen, ergeben sich folgende Detektionsraten für die beiden Methoden SBA und PCR:

Bei 9 von 14 untersuchten Patienten mit peripherem Befall konnte die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 64.3%.

Bei 1 von 4 untersuchten Patienten ohne Nachweis eines peripheren Befalls konnte die bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 25.0%.

Bei 20 von 29 untersuchten Patienten mit peripherem Befall konnte die bcl-2 Translokation in MBR mit der Polymerase Kettenreaktion nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 69.0%.

Bei 4 von 6 untersuchten Patienten ohne Nachweis eines peripheren Befalls konnte die bcl-2 Translokation mit der Polymerase Kettenreaktion nachgewiesen werden. Das entspricht einer Häufigkeit von 66.7%.

Die Detektionsrate der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion ist annähernd gleich bei vorliegendem Hinweis auf einen Befall durch maligne Zellen im Blut oder Knochenmark durch die morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immunzytologie (SBA 64.3% versus PCR 69.0%), (Tabelle 31 bis Tabelle 34).

Durch die Southern Blot Analyse wird bei fehlendem Hinweis auf einen Befall durch maligne Zellen im Blut oder Knochenmark durch die morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immunzytologie eine deutlich niedrigere Detektionsrate an Zellen mit der Translokation t(14;18) erreicht als mit der Polymerase Kettenreaktion (SBA 25.0% versus PCR 66.7%) (Tabelle 26 bis Tabelle 29).

Unter den Patienten mit Nachweis eines Knochenmarksbefalls mit Zellen mit der bcl-2 Translokation waren 3 Pat. mit klinischer kompletter Remission, 4 Pat. im klinischen Stadium I A oder I B, 4 Pat. im klinischen Stadium II A oder II B. Würde der Nachweis der bcl-2 Translokation t(14;18) als eindeutiger Befall mit malignen Lymphomzellen angesehen, müsste die Heraufstufung in das Stadium IV erfolgen.

Der Nachweis von Zellen im Knochenmark, die die bcl-2 Translokation t(14;18) tragen, obwohl eine klinische komplette Remission nach erfolgter Strahlentherapie, Chemotherapie oder nach Stammzelltransplantation bei fehlendem Hinweis auf Befall durch morphologische Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immunzytologie eintrat, kann bedeuten, dass noch maligne Zellen im Knochenmark oder in der Peripherie vorhanden sind. Inwieweit dieser Nachweis jedoch eine klinische Relevanz hat und ob es sich um aktive bzw. vermehrungsfähige Zellen handelt wird kontrovers diskutiert und ist Gegenstand laufender Studien (Lambrechts et al., 1991).

5.2.2 Unterschiede im Krankheitsverlauf der Patienten mit bcl-2 Translokation

Bezüglich des Allgemeinzustands bzw. der Leistungsfähigkeit nach WHO von 12 der untersuchten 35 Patienten in Stufe 0, von 7 Patienten in Stufe 1, von 12 Patienten in Stufe 2, von einem Patienten in Stufe 3 und von 4 Patienten in Stufe 4 ließ sich kein auffallender Unterschied herausstellen zwischen Patienten mit und ohne Nachweis einer bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse bzw. der Polymerase Kettenreaktion (Tabelle 35).

Bezüglich der Tatsache, dass bei Abschluss der Untersuchung von den 35 untersuchten Patienten 24 Patienten lebten, 3 vorzeitig aus der Beobachtungsgruppe ausgeschieden waren,

8 Patienten verstorben waren, ließ sich kein auffallender Unterschied herausstellen zwischen den Patienten mit und ohne Nachweis einer bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse bzw. der Polymerase Kettenreaktion (Tabelle 38).

5.2.3 Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Studien

Unser Ergebnis, dass sowohl die Southern Blot Analyse als auch die Polymerase Kettenreaktion ihre Grenzen beim Nachweis der bcl-2 Translokation t(14;18) hat, stimmt mit den Ergebnissen einiger anderer Studiengruppen überein (Wang et al., 1993, Price et al., 1991, Gribben et al., 1991, Lambrechts et al., 1992).

Da die Polymerase Kettenreaktion eine schnelle und kostengünstige Methode ist, wird sie zunehmend in der Routine-Diagnostik eingesetzt zur Frühdiagnose, zum Staging und zur Verlaufsuntersuchung (Sioutos et al., 1995). Durch zwischenzeitliche Weiterentwicklung und Automatisierung der Methode mit anschließender computergesteuerter Sequenzanalyse der PCR Produkte wird innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis erzielt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studiengruppe Yunis et al., 1989 konnte bei Patienten in unserer Untersuchungsgruppe mit CB-CC oder CB Non-Hodgkin Lymphom mit Nachweis einer bcl-2 Translokation t(14;18) mit der Southern Blot Analyse bzw. der Polymerase Kettenreaktion kein schlechteres Ansprechen auf die Therapie gezeigt werden als bei Patienten ohne Nachweis einer bcl-2 Translokation. Unsere Ergebnisse stimmen überein mit den Ergebnissen von Levine et al., 1988, Pezella et al., 1992.

In neueren genetischen Studien beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte anhand des bcl-2 homologen Proteins CED-9 gezeigt werden, dass es eine Vielzahl von bcl-2 verwandten Proteinen, die Bcl2-Proteinfamilie, mit gemeinsamen homologen Domänen BH1 bis BH4 gibt mit der Fähigkeit, homologe oder heterologe Dimere zu bilden und dadurch die Apoptose regulieren. Bcl-2, Bax und Bcl-x_L können darüber hinaus ionendurchlässige Poren in künstlichen Membranen bilden. Zur Familie der bcl-2 verwandten Proteine gehören neben den Zelltod-Antagonisten bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 und Bcl2A1 die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bcl-x_S, Bak und Bad.

Das Verhältnis von Zelltod-Agonisten zu Antagonisten bestimmt die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber einem Zelltod-Stimulus. Bcl-2 kann die Zellreifung an mehreren Stadien der Lymphozyten-Entwicklung aufrechterhalten. Nach neueren Erkenntnissen trägt nicht das Protein bcl-2 alleine, sondern eine Vielzahl von Molekülen der bcl-2 Familie zur Regulation des Zellzyklus bei (Yang et al., 1996, Chao et al., 1998, Mc Kusick et al., 2004).

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Untersuchung der Polymerase Kettenreaktion und der Southern Blot Analyse beim Nachweis der bcl-2 Translokation bei Patienten mit centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen durchgeführt.

Erstes Ziel war die Ermittlung der Häufigkeit der bcl-2 Translokation t(14;18) im Bereich der MBR im Knochenmark bei einer Gruppe von Patienten mit centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München. Zweites Ziel war die Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion im Nachweis der t(14;18) (q32;q21) Translokation als Indikator für Organbefall im Vergleich mit der histologischen, cytologischen und immunocytoologischen Untersuchung des Knochenmarks oder des peripheren Blutes. Drittes Ziel war die Untersuchung der Frage, inwieweit die Polymerase Kettenreaktion bzw. die Southern Blot Analyse zur Verlaufsbeobachtung bei centroblastisch-centrocytischen und centroblastischen Non-Hodgkin Lymphomen geeignet ist und ob sich Patienten mit oder ohne eine nachgewiesene bcl-2 Translokation bezüglich Allgemeinbefinden nach WHO-Einteilung und des klinischen Krankheitsstadiums unterscheiden.

Die Southern Blot Analyse ist eine sensitive, jedoch zeit- und kostenintensive Methode zum Nachweis der bcl-2 Translokation t(14;18). Allein der Schritt der Autoradiographie der Röntgenfilme kann über 7-14 Tage dauern. Daher ist die SBA weniger für Routinediagnostik geeignet. Es wird eine Mindestmenge von 10 µg DNS pro Restriktionsenzym-Verdauprozess, in der Regel 30 µg DNS benötigt, die nicht bei jeder Patientenprobe zur Verfügung steht. Störfaktoren können unter anderem ein unvollständiger Enzymverdau durch Restriktionsenzyme, Verunreinigung der DNS durch Proteine und Salze, Strangbrüche der DNS bei zu langem Enzymverdau oder nach erfolgter Chemotherapie sein. In unserer Untersuchungsgruppe konnte nur bei 17 von 35 Patienten die Southern Blot Analyse genomischer DNS erfolgreich durchgeführt werden; bei einem von 35 Patienten konnte das Ergebnis der SBA nicht beurteilt werden. Die SBA kann die bcl-2 Translokation t(14;18) unabhängig von der Bruchpunktregion nachweisen. Bei 3 von 17 Patientenproben (17.6%) mit negativer PCR gelang ein Nachweis der Translokation t(14;18) in der SBA. Jedoch kann der für jeden Patienten individuelle genaue Bruchpunktort nicht nachgewiesen werden. Durch die SBA wurde in der vorliegenden Arbeit bei fehlendem Hinweis auf einen Befall durch maligne Zellen im Blut oder Knochenmark durch die morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immunocytoologie eine deutlich niedrigere Detektionsrate an Zellen mit der Translokation t(14;18) erreicht als mit der PCR (SBA 25.0% versus PCR 66.7%).

Die Polymerase Kettenreaktion kann eine maligne Zelle unter 10^6 Zellen detektieren. Die Methode ist schnell und kostengünstig. In unserem Versuchsansatz lag das Ergebnis im Durchschnitt innerhalb eines Tages vor. Bei allen der untersuchten 35 Patientenproben konnte die PCR erfolgreich durchgeführt werden. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der Polymerase Kettenreaktion ist eine Southern Blot Analyse der PCR Amplifikate zu empfehlen, da in der vorliegenden Arbeit bei 6 von 35 Patienten (17.1%), bei denen in der Gelelektrophorese der PCR Amplifikate keine Bande detektierbar war, in der Southern Blot Analyse der PCR Produkte eine Bande dargestellt werden konnte. Die Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen für die individuellen Laborgeräte und Materialien ist

unabdingbar. Unter anderem kann die Änderung von Anlagerungstemperatur, MgCl₂-Konzentration, DNS-Menge, Konzentration der Nukleotide, Art des Verdunstungsschutzfilms, Konzentration des Agarosegels, Betriebsart des Thermocycler-Gerätes eine Störquelle bilden und zum Teil hohen Zeit- und Kostenaufwand bis zur Optimierung der Versuchsbedingungen erfordern.

Da in unserem Patientengut keine cytogenetische Untersuchung durchgeführt wurde, die eine Translokation t(14;18) nachweist, sondern nur Untersuchungen auf einen Befall mit malignen Lymphomzellen im Blut oder Knochenmark (Cytologie, Immuncytologie, Knochenmarkhistologie), die nicht obligat die Translokation t(14;18) tragen, fehlte uns ein Referenzwert zur Untersuchung der Sensitivität und Spezifität der Polymerase Kettenreaktion und der Southern Blot Analyse.

Bei 17 von 35 Patientenproben, bei denen die SBA nicht durchgeführt werden konnte waren 11 (31.4%) in der PCR positiv. Bei einer von 35 Patientenproben, bei der die SBA nicht beurteilbar war fiel die PCR positiv aus (2.9%).

Bei 3 von 17 (17.6%) Patientenproben, bei denen die SBA positiv ausfiel war die PCR negativ. Bei 5 von 17 (29.4%) Patientenproben, bei denen die SBA negativ ausfiel war die PCR positiv.

Bei 3 von 17 Patientenproben (17.6%) mit negativer PCR gelang ein Nachweis der Translokation t(14;18) in der SBA, bei 5 von 17 Patientenproben (29.4%) mit negativer SBA gelang ein Nachweis in der PCR.

Sowohl die Southern Blot Analyse als auch die Polymerase Kettenreaktion haben ihre Grenzen der Sensitivität und Spezifität im Nachweis der Translokation t(14;18). Bei 29.4% der PCR positiven Patientenproben entging der SBA der Nachweis, bei 17.6% der SBA positiven Patientenproben entging der PCR der Nachweis. Beide Methoden sollten daher zum Nachweis der bcl-2 Translokation kombiniert angewendet werden.

Die Häufigkeit der bcl-2 Translokation in unserer Untersuchungsgruppe mit 35 Patienten im Einzugsgebiet des Tumorzentrums München ist mit 77.1% für die kombinierte Anwendung von PCR und SBA vergleichbar mit der Häufigkeit, die in der Literatur für Patientengruppen in den USA, in Großbritannien und in den Niederlanden angegeben wird. Die bcl-2 Translokation konnte mit der Southern Blot Analyse bei 58.8%, mit der Polymerase Kettenreaktion bei 68.6% der Patienten nachgewiesen werden. Wurden beide Methoden kombiniert, betrug die Nachweisquote 77.1%.

Bei 82.9% der Patienten konnte ein peripherer Befall mit Lymphomzellen durch Kombination der morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie oder Immuncytologie nachgewiesen werden, dagegen bei 47.1% durch die Histologie allein. Daher sollten die Histologie, Cytologie und Immuncytologie zum Nachweis eines peripheren Befalls kombiniert eingesetzt werden.

Die Detektionsrate der Southern Blot Analyse und der Polymerase Kettenreaktion ist annähernd gleich bei vorliegendem Hinweis auf einen Befall durch maligne Zellen im Blut oder Knochenmark durch die morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und Immuncytologie (SBA 64.3% versus PCR 69.0%). Durch die Southern Blot Analyse wird bei fehlendem Hinweis auf einen Befall durch maligne Zellen im Blut oder Knochenmark durch die morphologischen Untersuchungsmethoden Histologie, Cytologie und

Immunocytoologie eine deutlich niedrigere Detektionsrate an Zellen mit der Translokation t(14;18) erreicht als mit der Polymerase Kettenreaktion (SBA 25.0% versus PCR 66.7%). Bei fehlendem morphologischem Nachweis eines peripheren Befalls eignet sich die PCR zum Nachweis der bcl-2 Translokation deutlich besser als die SBA.

Unter den Patienten mit Nachweis eines Knochenmarksbefalls mit Zellen mit der bcl-2 Translokation waren 3 Pat. mit klinischer kompletter Remission, 4 Pat. im klinischen Stadium I A oder I B, 4 Pat. im klinischen Stadium II A oder II B. Würde die bcl-2 Translokation t(14;18) als typisch für die malignen Lymphomzellen angesehen, müsste die Heraufstufung in das Stadium IV erfolgen.

Patienten aus unserer Untersuchungsgruppe mit Nachweis einer bcl-2 Translokation mit der Southern Blot Analyse bzw. der Polymerase Kettenreaktion zeigten keinen auffallenden Unterschied im klinischen Verlauf des CB-CC oder CB Non-Hodgkin Lymphoms im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis einer bcl-2 Translokation. Die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der großen Varianz der klinischen Verlaufsbeobachtungsdauer und der uneinheitlichen Therapie bei den untersuchten Patienten nur eingeschränkt auswertbar.

Durch zwischenzeitliche Weiterentwicklung und Automatisierung der Polymerase Kettenreaktion mit anschließender computergesteuerter Sequenzanalyse der PCR Produkte wird innerhalb weniger Stunden ein Ergebnis erzielt. Die PCR wird nicht nur in der Lymphomdiagnostik, sondern bei einer Vielzahl von Erkrankungen, z. B. Infektionskrankheiten, Erbkrankheiten, Stoffwechselerkrankungen zunehmend als Routine-Methode eingesetzt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Achille A, Scarpa A, Montresor M, Scardoni M, Zamboni G, Chilosi M, Capelli P, Franzin G, Menestrina F. Routine application of polymerase chain reaction in the diagnosis of monoclonality of B-cell lymphoid proliferations. *Diagnostic Molecular Pathology*, 4 (1995); 14-24.
- (2) Adorf D, Diem H, Totok G, Nerl C. Immunzytologische Untersuchungen bei malignen Lymphomen. *Manual Maligne Lymphome*, Herausgeber: Emmerich B, 7. überarbeitete Auflage, W. Zuckerschwerdt Verlag, München (2004).
- (3) Aisenberg AC, Wilkes BM, Jacobson JO. The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood*, 71 (1988); 969-972. (Abstract)
- (4) Aisenberg AC. Utility of gene rearrangements in lymphoid malignancies. *Annu Rev Med*, 44 (1993); 75-84.
- (5) Alkan S, Lehman C, Sarago C, Sidawy MK, Karcher DS, Garrett CT. Polymerase chain reaction detection of immunoglobulin gene rearrangement and bcl-2 translocation in archival glass slides of cytologic material. *Diagnostic Molecular Pathology*, 4 (1995); 25-31.
- (6) Armitage P, Berry E. *Statistical methods in medical research*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1987, S. 474.
- (7) Ausubel FM et al. *Short protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, 2nd Edition (1992); A3.5-A3.6.
- (8) Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosome breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit of 18. *Cell*, 41 (1985); 899-906.
- (9) Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, Seto M, Owens J, Cossman J, Jensen JP, Goldman P, Korsmeyer SJ. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: Structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (1987); 2396-2400.
- (10) Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunology Today*, 10 (1989); 351-355.
- (11) Benitez J, Robledo M, Santon A, Santos M, Rivas C, Echezarreta G, Castro PM. Correlation between cytogenetic and molecular analysis of t(14;18) in follicular lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 59 (1992); 68-72.
- (12) Berinstein NL, Jamal HH, Kuzniar B, Klock RJ, Reis MD. Sensitive and reproducible detection of occult disease in patients with follicular lymphoma by PCR amplification of t(14;18) both pre- and post-treatment. *Leukemia*, 7 (1993); 113-119.
- (13) Brittinger G, Engelhard M. Klinisch-prognostische Bedeutung der Kiel-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 76 (1992); 37-46.

- (14) Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, 16 (1998); 395-419.
- (15) Chou Q, Russel M, Birch D, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20 (1992); 1717-1723.
- (16) Christgau, H. Die Southern Blot Analyse als Diagnose- und Verlaufparameter bei Non-Hodgkin Lymphomen: Untersuchung der Genkonfiguration der Antigenrezeptorgene und des Bcl-2 Onkogens. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (1995).
- (17) Church GM, Gilbert W. Genomic Screening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 (1984), 1991-1995.
- (18) Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 (1985); 7439-7443.
- (19) Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med*, 164 (1986); 315-320.
- (20) Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, 47 (1986); 19-28.
- (21) Coiffier B, Bastion Y, Berger F, Felman P, Bryon PA. Prognostic factors in follicular lymphomas. *Seminars in Oncology*, 20, 5 Suppl. 5 (1993); 89-95.
- (22) Conlan MG, Bast M, Armitage JO, Weisenburger DD. Bone marrow involvement by Non-Hodgkin's Lymphoma: The clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. *J Clin Oncology*, 8 (1990); 1163-1172.
- (23) Cotter FE, Zucca E. Altered gene expression and oncogenesis of B-cell neoplasia. *Annals of Oncology*, 2 (1991); 335-342.
- (24) Crescenzi M, Seto M, Herzig JP, Weiss PD, Griffith RG. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 (1988); 4869-4873.
- (25) Crisan D, Anstett MJ, Matta N, Farkas H. Detection of bcl-2 oncogene rearrangement in follicular lymphoma: nucleic acid hybridisation and polymerase chain reaction compared. *Clinical Chemistry*, 39 (1993); 1980-1982.
- (26) Crisan D, Chen ST, Weil SC. Polymerase chain reaction in the diagnosis of chromosomal breakpoints. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 8 (1994); 725-750.

- (27) Dibbert B, Simon HU. Die molekularen Mechanismen der Apoptose. Bericht von der vierten Eurokonferenz über Apoptose. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 122 (1997); 523-526.
- (28) Dyer MJS, Fischer P, Nacheva E, Labastide W, Karpas A. A new human B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t(14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. Blood, 75 (1990); 709-714.
- (29) Dyer MJS, Lillington DM, Bastard C, Tilly H, Lens D, Heward JM, Stranks G, Morilla R, Monard S, Gugliemi P, Kluin-Nelemans JC, Hagemeijer A, Young BD, Catovsky D. Concurrent activation of MYC and Bcl2 in B cell non-Hodgkin lymphoma cell lines by translocation of both oncogenes to the same immunoglobulin heavy chain locus. Leukemia, 10 (1996); 1198-1208.
- (30) Emmerich B (Herausgeber), Hiller E, Nerl C; Schneller F, Dietzfelbinger H. Manual Maligne Lymphome, 7. überarbeitete Auflage, W. Zuckerschwerdt Verlag, München (2004).
- (31) Fey MF, Kulozik AE, Hansen-Hagge TE, Tobler A. The polymerase chain reaction: a new tool for the detection of minimal residual disease in haematological malignancies. European Journal of Cancer, 27 (1991); 89-94.
- (32) Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNS restriction nuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., 132 (1983), 6-13.
- (33) Fifth International Workshop on Chromosomes in Leukemia-Lymphoma (1987): Correlation of chromosome abnormalities with histologic and immunologic characteristics in Non-Hodgkin's lymphoma and adult T cell leukemia-lymphoma. Blood, 70 (1987); 1554-1564.
- (34) Finke J, Slanina J, Lange W, Dölken G. Persistence of circulating t(14;18)-positive cells in long-term remission after radiation therapy for localized-stage follicular lymphoma. J Clin Oncology, 11(1993); 1668-1673.
- (35) Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D et al. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. Cancer Res, 39 (1979); 3119-3128.
- (36) Gribben JG, Nadler LM. Monitoring minimal residual disease. Seminars in Oncology, 20 (1993); 143-155.
- (37) Gribben JG, Nadler LM. Detection of Minimal Residual Disease in Patients with Lymphomas Using the Polymerase Chain Reaction. Important Advances in Oncology, 1994; 117-129.
- (38) Grogan TM, Miller TP. Immunobiologic Correlates of Prognosis in Lymphoma. Seminars in Oncology, 20 (1993); 58-74.
- (39) Hagen-Mann K, Mann W. Polymerase Chain Reaction. Eine revolutionäre Methode für die Biologie. Biologie in unserer Zeit, 20 (1990); 257-262.

- (40) Hallek M, Wanders L, Strohmayer S, Emmerich B. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Haematol*, 65 (1992), 1-5.
- (41) Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84 (1994); 1361-1392.
- (42) Hickish TF, Purvies H, Mansi J, Soukop M, Cunningham D. Molecular monitoring of low grade non-Hodgkin's lymphoma by gene amplification. *British Journal of Cancer*, 64 (1991); 1161-1163.
- (43) Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO. Lymphoma classification-the gap between biology and clinical management is closing. *Blood*, 88 (1996); 4085-4089.
- (44) Hiddemann W, Unterhalt M. Stand und Perspektiven in der Therapie follikulärer Keimzentrumslymphome. *Deutsches Ärzteblatt*, 95 (1998), C2260-C2266.
- (45) Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348 (1990); 334-336.
- (46) Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Goldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, Southern analysis and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 103 (1994); 472-78.
- (47) Johnson PWM, Price CGA, Smith T, Cotter FE, Meerabux J, Rohatiner AZS, Young BD, Lister, TA. Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 12 (1994); 798-805.
- (48) Kluin PM, van Krieken JH. The molecular biology of B-cell lymphoma: Clinicopathologic implications. *Annals of Hematology*, 62 (1991); 95-102.
- (49) Kneba M, Eick S, Herbst H, Willigeroth S, Pott C, Bolz I, Bergholz M, Neumann C, Stein H, Krieger G. Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel Classification: analysis by direct DNS sequencing. *Cancer Research*, 51 (1991); 3243-3250.
- (50) Korsmeyer SJ. Programmed cell death: bcl-2. *Important Advances in Oncology*, 1993; 19-28.
- (51) Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends in Genetics*, 11 (1995); 101-105.
- (52) Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Phlipppo K, Geelen E, van Krieken JHJM, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM. Clinical Relevance of Bcl2, Bcl6 and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*, 92 (1998); 3152-3162.

- (53) Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339 (1989); 237-238.
- (54) Lambrechts AC, De Ruiter PE, Dorssers LCJ, Van't Veer MB. Detection of residual disease in translocation (14;18) positive Non-Hodgkin's lymphoma, using the polymerase chain reaction: A comparison with conventional staging methods. *Leukemia*, 6 (1992); 28-34.
- (55) Lee M S. Molecular Aspects of Chromosomal Translocation t(14;18). *Seminars in Hematology*, 30 (1993); 297-305.
- (56) Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphoma. *British Journal of Haematology*, 31 (1975); 193.
- (57) Lennert K, Feller A. Lennert K. *Histopathology of Non-Hodgkin's lymphomas*. Springer Verlag, Berlin (1992).
- (58) Levine EG, Arthur DC, Frizzera G, Peterson BA, Hurd DD, Bloomfield CD. Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Internal Medicine*, 108 (1988); 14-20.
- (59) Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young DD, van Ommen GJ, Kluin PM. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*, 6 (1991); 2271-2276.
- (60) Litam P, Swan F, Cabanillas F, Tucker S, McLaughlin P, Hagemester FB, Rodriguez A, Velasquez WS. Prognostic Value of Serum β -2 Microglobulin in Low-Grade Lymphoma. *Annals of Internal Medicine*, 114 (1991); 855-860.
- (61) Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. Bcl2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (1994); 8910-8914.
- (62) Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34 (1974); 1488-1503.
- (63) Mc Kusick VA, Hurko O, Macke PJ et al. Online mendelian inheritance in man. Oncogene B-cell Leukemia 2. Entry 151430. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, USA. (2004).
- (64) Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *New England Journal of Medicine*, 318 (1988); 1638-1644.
- (65) Nickenig C, Dreyling M, Nerl C, Dietzfelbinger H, Nieder C, Unterhalt M, Hiddemann W. Follikuläre und andere indolente Lymphome. *Manual Maligne Lymphome*, Herausgeber: Emmerich B, 7. überarbeitete Auflage, W. Zuckerschwerdt Verlag, München (2004).
- (66) Nishiuchi R, Yoshino T, Teramoto N, Sakuma I, Hayashi K, Nakamura S, Seino Y, Akagi T. Clonal Analysis by Polymerase Chain Reaction of B-Cell Lymphoma with Late Relapse. *Cancer*, 77 (1996); 757-762.

- (67) Orrego C. Organizing a laboratory for PCR work. In PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc., edited by Innis M A et al. (1990); 447-454.
- (68) Pezella F, Ralfkiaer E, Gatter KC, Mason DY. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematology*, 76 (1990); 58-64.
- (69) Pezella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersbøll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer*, 65 (1992); 87-89:
- (70) Pileri SA; Ceccarelli C; Sabattini E; Santini D; Leone O; Damiani S; Leoncini L; Falini B. Molecular findings and classification of malignant lymphomas. *Acta Haematologica*, 95 (1996); 181-187.
- (71) Price CGA, Meerabux J, Murtagh S, Cotter FE, Rohatiner AZS, Young BD, Lister TA. The significance of circulating cells carrying t(14;18) in long remission from follicular lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 9 (1991); 1527-1532.
- (72) Preiß J, Hagmann FG, Dornoff W, Schmieder A. Empfehlungen zur Therapie in der Onkologie. Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saar-Pfalz-Mosel e.V., Linzt-Druck, Trier (1995).
- (73) Raghoebar S, Broos L, Kramer MHH, Van Krieken JHJM, Kluin-Nelemans JC, van Ommen GJB, Kluin PM. Histological conversion of follicular lymphoma with structural alterations of t(14;18) and immunoglobulin genes. *Leukemia*, 9 (1995); 1748-1755.
- (74) Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. Atlas of Tumor Pathology, Series I, Section III, Fascicle 8. Washington D. C., Armed Forces Institute of Pathology, 1996.
- (75) Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer SJ, Waldmann T, Leder P. Structure of the human immunoglobulin μ locus: Characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell*, 27 (1981); 583-591.
- (76) Reed, JC. Bcl-2: Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 9 (1995); 451-473.
- (77) Rosenberg SA, Boiron M, DeVita VTJr, Johnson RE, Burton JL, Ultmann JE, Viamonte MJr. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Procedures. *Cancer Research*, 31 (1971); 1862-63.
- (78) Rosenberg SA et al. Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. *Cancer*, 49 (1982); 2112-2135.
- (79) Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science*, 239 (1986); 487-491.

- (80) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press (1989), Plainview, NY, 2nd Ed.
- (81) Schimmel U. PCR. Die Fußangeln einer Technik und die Wege zur Perfektionisierung. BioTec. April 1990, Sonderdruck, Vogel Verlag und Druck, Würzburg.
- (82) Séité P, Hillion J, d'Agay MF, Gaulard P, Cazals D, Badoux F, Berger R, Larsen CJ. Bcl2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report an 64 cases. *Leukemia*, 7 (1993); 410-417.
- (83) Sioutos N, Bagg A, Michaud GY, Irving SG, Hartmann DP, Siragy H, Oliveri DR, Locker J, Cossman J. Polymerase chain reaction versus southern blot hybridization. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Diagnostic Molecular Pathology*, 4 (1995); 8-13.
- (84) Soubeyran P, Cabanillas F, Lee MS. Analysis of the expression of the hybrid gene bcl-2/IgH in follicular lymphomas. *Blood*, 81 (1993); 122-127.
- (85) Southern, EM. Detection of specific sequences among DNS fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.*, 98 (1975); 503-17.
- (86) Spinolo JA, Cabanillas F, Dixon DO, Khorana SM, McLaughlin P, Velasquez WS, Hagemester FB, Redman JR, Swan FJr. Therapy of relapsed or refractory low-grade follicular lymphomas: Factors associated with complete remission, survival and time to treatment failure. *Annals of Oncology*, 3 (1992); 227-232.
- (87) Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Wright DH, Mioduszezwska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, van Unnik J, Wright D. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*, 1 (1988); 292-293.
- (88) Stein H, Hiddemann W. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Deutsches Ärzteblatt*, 96 (1999); 2550-2557.
- (89) Tanaka S, Louie DC, Kant JA, Reed JC. Frequent incidence of somatic mutations in translocated bcl2 oncogenes of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 79 (1992); 229-237.
- (90) Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226 (1984); 1097-1099.
- (91) Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228 (1985); 1440-1443.
- (92) Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (1986); 5214-5218.
- (93) Turner GE, Ross FM, Krajewski AS. Detection of t(14;18) in British follicular lymphoma using cytogenetics, Southern blotting and the polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*, 89 (1994); 223-225.

- (94) Wang J, Raffeld M, Medeiros LJ, Longo DL, Jaffe ES, Duffey P, Stetler-Stevenson M. Follicular center cell lymphoma with the t(14;18) translocation in which the rearranged bcl-2 gene is silent. *Leukemia*, 7 (1993); 1834-1839.
- (95) Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 317 (1987); 1185-1189.
- (96) Willis TG, Jadayel DM, Ciognet LJA, Abdul-Rauf M, Treleaven JG, Catovsky D, Dyer MJS. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 90 (1997); 2456-2464.
- (97) Yabumoto K, Akasaka T, Muramatsu M, Kadowaki N, Hayashi T, Ohno H, Fukuhara S, Okuma M. Rearrangement of the 5' cluster region of the Bcl2 gene in lymphoid neoplasm: a summary of nine cases. *Leukemia*, 10 (1996); 970-977.
- (98) Yuan R, Dowling P, Zucca E, Diggelmann H, Cavalli F. Detection of bcl-2/JH rearrangement in follicular lymphoma: concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis. *British Journal of Cancer* 67 (1993); 922-925.
- (99) Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 307 (1982); 1231-1236.
- (100) Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 320 (1989); 1047-1054.
- (101) Zelenetz AD, Chu G, Galili N, Bangs CD, Horning SJ, Donlon TA, Cleary ML, Levy R. Enhanced detection of the t(14;18) translocation in malignant lymphoma using pulsed-field gel electrophoresis. *Blood*, 78 (1991); 1552-1560.
- (102) Zelenetz AD, Chen T, Levy R. Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J Exp Med*, 176 (1992); 1137-1148.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. B. Emmerich

danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Förderung dieser Arbeit, die im hämato-onkologischen Forschungslabor an der Medizinischen Klinik Innenstadt des Klinikums der Universität München durchgeführt wurde.

Herrn Dr. W. Spann

danke ich für die tatkräftige Unterstützung in der Anfangsphase der Arbeit.

Frau Prof. Dr. K. Pachmann

gilt mein besonderer Dank für die großzügige wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, Anregungen, geduldige und fürsorgliche Betreuung der Arbeit.

Frau B. Schnabel und Frau U. Göhly

danke ich für die unermüdliche Hilfe beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden und bei der Durchführung der Versuche.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern

der Hämato-Onkologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt des Klinikums der Universität München, des Klinikums Großhadern der Universität München, des Städtischen Krankenhauses München Schwabing, des Pathologischen Instituts der Universität München danke ich für ihre Unterstützung.

Meinen Eltern

gilt mein unendlicher Dank für ihre unermessliche persönliche Unterstützung und Liebe.

LEBENS LAUF

Name Arcan Demircioglu
Geburtsdatum 15. Oktober 1967
Geburtsort Terme, Türkei

Schulbildung

1973-1979 Grundschule in Terme, Türkei
1979-1982 Hauptschule in Mitwitz, Qualifizierender Abschluss
1982-1986 Berufsschule in Coburg, Kfz-Mechaniker, Gesellenbrief
1986-1987 Berufsaufbauschule in Coburg, Fachschulreife
1987-1989 Berufsoberschule in Bayreuth, Allgemeine Hochschulreife

Studium

11/1989-04/1996 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1994-1996 Studienstipendium John Loesch, USA

Beruf

05/1996 - 11/1997 Arzt im Praktikum
Dr. von Haunersches Kinderspital in München

06.11.1997 Approbation als Arzt

11/1997 - 11/1998 Assistenzarzt in Kinderarztpraxis in München
03/1999 - 09/2000 Assistenzarzt
Städtisches Kinderkrankenhaus München Harlaching

10/2000 - 02/2001 Assistenzarzt in Kinderarztpraxis in München
03/1999 - 09/2000 Assistenzarzt
Kinderzentrum München, Sozialpädiatrisches Zentrum,
Fachklinik für Sozialpädiatrie und Entwicklungsrehabilitation

20.06.2002 Anerkennung als Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin

Seit 09/2002 Niederlassung in eigener Kinder - und Jugendarztpraxis in München