

Nachweis von minimaler Resterkrankung bei malignen B-Zell-Erkrankungen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion¹

Detection of Minimal Residual Disease by the Polymerase Chain Reaction in B Cell Malignancies

Marion Moos^{2,3}, Renate Schulz², F. Cremer², Katja Kiel², Dagmar Schmohl², H. Döhner², H. Goldschmidt², R. Haas²

Zusammenfassung: Die Einsatzmöglichkeiten der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis von minimaler Resterkrankung (MRD) bei Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) und multiplem Myelom (MM) und bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) der Subklasse M4Eo wurden überprüft. Grundlage für die Anwendung eines PCR-Ansatzes für diese Krankheitsentitäten sind folgende spezifischen Genrearrangements: die t(14;18) Translokation bei NHL, das klonale Rearrangement der schweren Ketten der Immunglobulingene, das zu einer einzigartigen, den Tumor auszeichnenden „Complementarity determining region 3“ (CDR3) beim MM führt, und die Inversion 16, die spezifisch für die M4Eo Subklasse der AML ist. Für das NHL konnte gezeigt werden, daß eine Persistenz bzw. ein Wiederscheinen von t(14;18) positiven Zellen mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht. Bei Patienten mit MM fand sich in der Mehrzahl der Leukaphereseprodukte eine Kontamination mit Tumorzellen, nicht jedoch in durchflußzytometrisch gewonnenen hochreinen CD34+ Zellfraktionen. Die Ergebnisse bei Patienten mit AML M4Eo und Inversion 16 sind bis jetzt vorläufig. Untersuchungen des Tumorzellgehaltes von peripheren Blutstammzelltransplantaten und denen aus Knochenmark gewonnenen ergaben eine niedrigere Kontamination der LP. Es kann festgestellt werden, daß PCR-Verfahren wertvolle Informationen zu Tumorzellgehalten von Transplantaten und minimaler Resterkrankung geben können. Weiterhin können neuere Behandlungsmöglichkeiten wie Anreicherungsverfahren zur Tumorreduktion *ex*

vivo und von Dosisintensivierungsprogramme zur Tumorreduktion *in vivo* in ihrer Effizienz überprüft werden.

Schlüsselwörter: Polymerasekettenreaktion/Methodik; Neoplasmen, Residuale/Diagnostik; Hämatopoetische Stammzell-Transplantation; Lymphome, Non-Hodgkin; Multiples Myelom; Leukämie, myeloische, akute.

Abstract: The prognostic value of the detection of minimal residual disease (MRD) with the help of the polymerase chain reaction (PCR) was investigated in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL), multiple myeloma (MM), and acute myeloid leukemia (AML) of the subclass M4Eo. Basis for the application of a PCR-assay in these disease entities are the following specific gene rearrangements: the t(14;18) translocation in NHL, the clonal rearrangement of the Ig heavy chain locus resulting in a unique complementarity determining region 3 (CDR3) for MM and the inversion 16 characteristic for the M4Eo subclass of AML. For the (14;18) marker it could be shown that persistence or re-appearance of t(14;18) positive cells is correlated with a greater relapse probability. In patients with MM, the assessment of MRD in PBSC harvests by PCR showed contamination of the leukapheresis products by tumor cells while experimental preparative flow cytometry resulted in PCR-negativity of all CD34+ fractions. The results of the 13 patients with AML M4Eo and inversion 16 are preliminary. Examination of the tumor load in autologous progenitor cell grafts from different sources revealed a lower tumor cell contamination in PBSC grafts. In summary, PCR assays may provide important information on the extent of tumor cell contamination, especially when accompanying new treatment modalities such as enrichment procedures or dose intensification programs.

Keywords: Polymerase Chain Reaction/methods; Neoplasm, Residual/diagnosis; Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Lymphoma, Non-Hodgkin's; Multiple Myeloma; Leukemia, Myeloid, Acute.

¹Vorgetragen auf dem 6. Symposium der Reihe „Standardmethoden in der Hämatologie“ des Arbeitskreises Hämatologische Laborarbeit, Qualitätssicherung und Normung, DGHO-Jahrestagung Oktober 1996 in Düsseldorf

²Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universität Heidelberg

³Korrespondenzadresse: Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universität Heidelberg, Hospitalstrasse 3, D-69115 Heidelberg. Fax: +49-6221-563813

Eingegangen: 6. März 1997

Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken und ihre Anwendung bei der Begleitung klinischer Studien hat zu einer wesentlich höheren Sensitivität im Nachweis residueller neoplastischer Zellen geführt. Dies trifft auch für die malignen Hämoblastosen zu, wo Dosisintensivierungs- und Anreicherungsprogramme unter Einfluß der Gabe hämatopoetischer Stammzellen zu einer Tumorreduktion sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* führen sollen. Speziell die Anwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion konnte häufig die Anwesenheit residueller neoplastischer Zellen in Patienten in kompletter klinischer Remission zeigen [1], was die Frage aufwarf, ob molekulare Remissionen in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben erzielt werden müssen, und ob dem molekularen Nachweis von Tumorzellen eine prognostische Aussagekraft zur Identifizierung von Patienten zukommt, die rezidivieren werden. Der Einsatz von PCR-Verfahren war möglich, da Tumorzellen sich häufig durch spezifische chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Inversionen und Deletionen auszeichnen. Diese Genrearrangements führen zur Aktivierung von Protoonkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und stehen somit ursächlich mit der Entstehung der Krankheit in Verbindung. Drei unterschiedliche Arten an Rearrangements sind die Basis für die Ergebnisse, die hier im Rahmen des Nachweises residueller Tumorzellen bei folgenden Krankheitsentitäten vorgestellt werden sollen: die t(14;18) Translokation der niedrig und intermediär malignen NHLs, das klonale CDR3-Rearrangement des MM und die Inversion 16 der M4Eo-Subklasse der AML.

Material und Methoden

t(14;18) PCR

Genomische DNA aus peripheren Blut- (PB) und Knochenmark- (KM)-proben sowie aus Aliquots der Leukaphereseprodukte (LP) wurde durch Zellyse mit nichtionischen Detergentien und Proteinase K (Boehringer, Mannheim, Deutschland) isoliert. DNA der t(14;18) positiven Zelllinie K422 wurde als Positivkontrolle verwendet. Die PCR-Analysen umfaßten die „major breakpoint region“ (MBR) der bcl-2/IgH Translokation [2] und wurden in einem „nested“ Ansatz durchgeführt. Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 2 µg DNA in Anwesenheit von 0,001% Gelatine, 50

mmol/l Kaliumchlorid, 20 mmol/l Tris-HCl pH 8,3, 2,0 mmol/l Magnesiumchlorid, 200 mmol/l der vier 2'-Desoxynukleotide, 50 pmol der beiden Primer und 2,5 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Die erste Amplifikation umfaßte 35 Zyklen mit den Oligonukleotiden 5'-GCAATCCGCATTTAATTCATGGTATTTCAGGAT-3' für die MBR Region und 5'-GGTGACCAGGGTCCCTTGGCCCCAG-3' für die Konsensus-Region der J-Segmente der schweren Kette der Immunglobulingene. Die Amplifikation startete mit einem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C. Jeder Zyklus umfaßte einen 1-minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C, einen gleichlangen Annealing-Schritt bei 65 °C gefolgt von einer Extension bei 72 °C für 1,5 Minuten. Der letzte Extensionsschritt wurde auf 10 Minuten verlängert. Die zweite Amplifikation mit einem 2 µl Aliquot erfolgte für 25 Zyklen mit einem internen Primerpaar folgender Sequenz: 5'-TTAGAGAGTTGCTTTA-3' für die MBR- und 5'-ACCAGGGTCCCTTGGCCCCA-3' für die JH-Konsensus-Region mit Denaturierung bei 94 °C, Annealing bei 60 °C und Extension bei 72 °C für jeweils eine Minute mit ebenfalls 10-minütiger Verlängerung des letzten Extensionsschrittes. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf 2,5%igen Agarosegelen, die 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Nach Transfer der DNA auf Nylonmembranen (Boehringer) wurde diese gegen ein Digoxigenin-markiertes bcl-2 spezifisches Oligonukleotid hybridisiert. Die Markierung des Oligonukleotids erfolgte mit Digoxigenin-2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat und terminaler Transferase nach Vorschrift des Herstellers (Boehringer). Die Entwicklung der Blots erfolgte mit CSPD (Boehringer) als Chemilumineszenzsubstrat. Jedes Experiment umfaßte eine Positivkontrolle mit 10 ng K422 DNA verdünnt in DNA gesunder Spender und eine Negativkontrolle ohne DNA. Jede Probe wurde zweimal analysiert. Die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA wurde mit einem internen bcl-2 Primerpaar überprüft (Dianova, Hamburg, Deutschland).

Identifizierung der Tumor-spezifischen CDR3-Region und davon abgeleitete Allel-spezifische Oligonukleotid-(ASO-) PCR

Ausgangsmaterial zur Identifizierung der tumorspezifischen CDR3-Region war Gesamt-RNA isoliert aus Knochenmarkproben der Patienten zur Diagnose oder vor Stammzellmobilisierung nach Chomczynsky und Sacchi [3]. Die cDNA-Synthese erfolgte mit „random“ Hexameren und Moloney-Murine Leukemia Virus Reverser Transcriptase (Perkin Elmer) und 2 µg RNA. Für die Amplifikation des gesamten cDNA-Ansatzes wurden die CDR3 Konsensus-Primer von Yamada et al. [4] verwendet, die um 11 bzw. 12 Nukleotide verlängert waren, um die folgenden Clonierungsschritte zu ermöglichen. Die Primer hatten folgende Sequenz: FR3A-Cl, 5'-CTGGTTTCGGCCCAACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3' und LJH-Cl, 5'-CTCGCTCGCCCATGAGGAGACGGTGACC-3'.

Nicht standardisierte Abkürzungen: AML, akute myeloische Leukämie; CD, cluster designation; CDR3, complementarity determining region 3; KM, Knochenmark; LP, Leukapherese; MBR, major breakpoint region; ASO-, allel-spezifische Oligonukleotid-MM, multiples Myelom; MRD, minimal residual disease; NHL, non-Hodgkins's disease; PB, peripheres Blut; PBSC, peripheral blood stem cells; PCR, polymerase chain reaction.

Die Amplifikation wurde mit Klentaq-Polymerase (Clontech, Heidelberg, Deutschland) für zunächst 15 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 55 °C und für weitere 25 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf hochauflösenden, 5%igen Agarosegelen aufgetrennt und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Führt die CDR3-PCR zu einer Bande, wurde diese direkt mit dem fmol sequencing kit (Promega, Heidelberg, Deutschland) sequenziert. Ansonsten wurden die ausgeschnittenen Banden in den pdirect-Vektor (Clontech) kloniert. Die Plasmid-DNA wurde nach Lyse der Bakterienklone mit 10 mmol/l Tris-HCL pH 7,5, 1 mmol/l EDTA und 100 µg/ml Proteinase K mit dem Sequitherm cycle-sequencing kit (Biozym, Göttingen, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzierungen erfolgten an einem automatischen Sequenzierer (ALF-express, Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Zur Identifizierung gleicher Klone wurde zunächst nur eine Base („C-tracks“) sequenziert. Zur Ableitung des Allel-spezifischen Oligonukleotids (ASO) wurde die Plasmid-DNA in beiden Richtungen komplett sequenziert.

Die nach präparativer Durchflußcytometrie gewonnenen CD34+ Zellfraktionen wurden direkt durch Zugabe von PCR-Puffer und Pretaq (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) lysiert. Von jedem Patienten wurden mindestens 2 ASO von der spezifischen CDR3 Region abgeleitet. Der ASO Primer diente als sense und der JH-Konsensus Primer als antisense Primer. Die optimale Annealing-Temperatur wurde für jeden patientenspezifischen Primer ausgetestet. Die PCR umfaßte 40 Zyklen. Die Analyse der Produkte erfolgte ebenfalls auf 5%igen Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegelen.

Inversion 16 Reverse Transcriptase (RT)-PCR

Isolierung von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese erfolgte wie bei der CDR3-PCR beschrieben. Die Analysen der Proben wurden in einem „nested“ PCR Ansatz durchgeführt. Die Primer entsprachen denen von Liu et al. [5] und waren für die erste Amplifikation die folgenden: C1, 5'-GCAGGCAAGGTGGTATATTGAAGG-3'; M1, 5'-CTCTTCTCCTCATTCTGCTC-3'. Die Annealing Temperatur betrug 65 °C. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Für die Reamplifikation eines 2 µl Aliquots der ersten PCR wurden folgende Primer eingesetzt: C2, 5'-ACACGCGAATTTGAA-GATAGAG-3'; M7, 5'-TTCTCCAGCTCATGGACCTCC-3'. Die Annealing Temperatur betrug hier 60 °C. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt. Zur Überprüfung der Reaktionen wurde mit der gleichen RNA β-Actin cDNA koamplifiziert (Promega, Heidelberg, Deutschland). Die Amplifikationsprodukte wurden auf 2.5%igen Agarosegelen aufgetrennt, die DNA anschließend auf Nylonmembranen transferiert und gegen ein bruchpunktspezifisches Digoxigenin-markiertes Oligonukleotid hybridisiert. Markierung des Oligonukleotids und Entwicklung der Blots erfolgte wie bei der t(14;18) PCR beschrieben.

Ergebnisse

Sequentielle Hochdosistherapie und PBSC-Transplantation bei Patienten mit NHL: Nachweis von t(14;18) positiven Zellen

Im Zuge der schlechten Prognose von Patienten mit fortgeschrittenen Stadien an NHL sind Hochdosistherapien entwickelt worden, die den Einsatz von hämatopoetischen Stammzellen notwendig machen. Da Lymphomzellen bei niedrig und intermediär malignen Lymphomen zu einem hohen Prozentsatz eine Translokation zwischen den Chromosomen 14q32, dem Genort der schweren Ketten der Immunglobuline, und dem Chromosom 18q21, dem Ort des bcl-2 Protooncogens, tragen, können residuale Tumorzellen mit einem PCR-Ansatz, der die Bruchpunkte umspannt, nachgewiesen werden. Derzeit gehen 53 Patienten mit einem heterogenen Krankheitsverlauf in die Studie ein. Alle Patienten erhielten eine Hochdosistherapie, die Ganzkörperbestrahlung und PBSC-Gabe beinhaltete. Zunächst wurden PB- und KM-Proben vor Mobilisierung untersucht, dann Aliquots der LP und Verlaufsproben nach Transplantation. T(14;18) positive Zellen konnten in 49 Patienten in Proben vor Beginn der cytotoxischen Chemotherapie nachgewiesen werden. Sechs Patienten waren hier in ihren KM-Proben PCR-negativ. Ein Patient wies nur im KM t(14;18) positive Zellen auf. Von 5 Patienten konnte nur eine Probe untersucht werden (3x KM; 2xPB), die aber jeweils PCR-positiv war (Abb. 1). Vier weitere Patienten wurden in die Studie aufgenommen, da Aliquots ihrer LP PCR-positiv waren (Abb. 1). 30% der Patienten (16 von 53) erzielten ein PCR-negatives Transplantat. Die

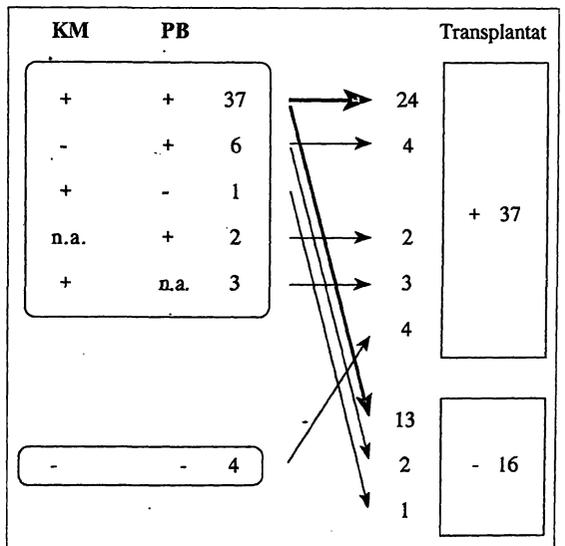


Abbildung 1 Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von Knochenmarks- (KM) und peripheren Blut- (PB)-Proben in Patienten mit niedrig oder intermediär malignen Non Hodgkin's Lymphomen vor peripherer Blutstammzell-Mobilisierung in Beziehung gesetzt zu den PCR Ergebnissen der Transplantate.

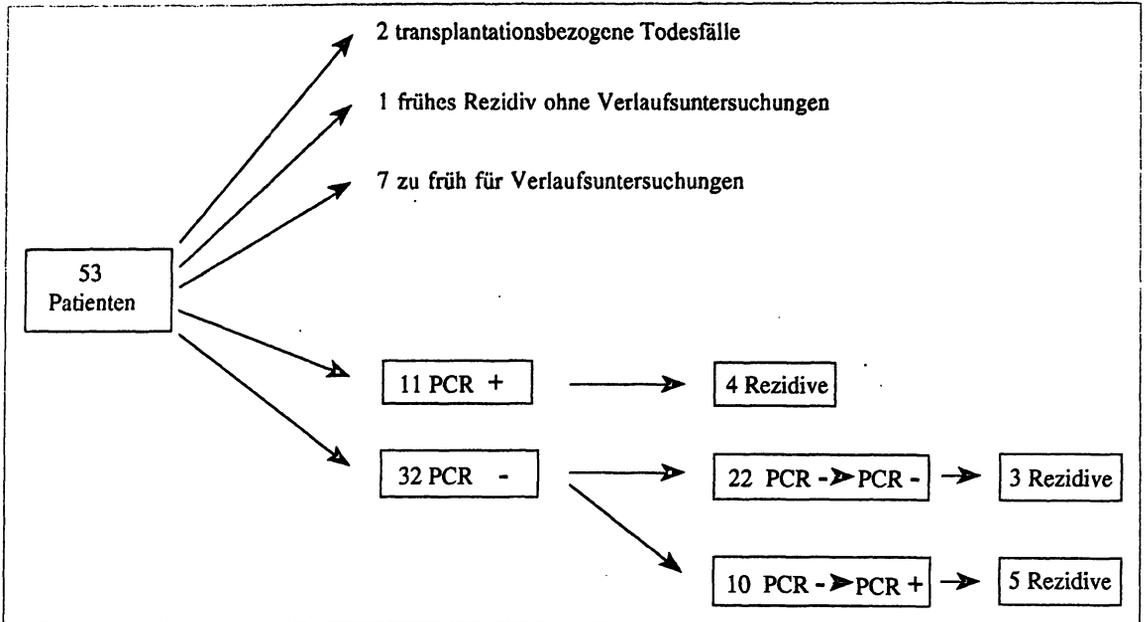


Abbildung 2 Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Knochenmarks- (KM) und peripheren Blut- (PB)-Proben in Patienten mit niedrig oder intermediär malignen Non Hodgkin's Lymphomen nach Transplantation peripherer Blutstammzellen in Beziehung gesetzt zu dem klinischen Verlauf der Patienten.

Beziehung zwischen den PCR-Befunden nach Transplantation und dem klinischen Verlauf ist in Abb. 2 dargestellt. Zwei der Patienten verstarben transplantationsbedingt, und ein Patient mit frühem Rezidiv blieb ohne PCR-Verlaufsuntersuchungen. Für 7 Patienten war es für eine Verlaufsuntersuchung zu früh, so daß 43 Patienten in ihrem klinischen Verlauf mit den PCR-Ergebnissen korreliert werden konnten. Zweiunddreißig Patienten konvertierten im Verlauf zu PCR-Negativität, 10 bereits in ihrem Transplantat, 22 weitere im Verlauf von 3 bis 23 Monaten nach Transplantation. In dieser Gruppe kam es zu 3 Rezidiven, ohne daß PCR-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Krankheit trat an der schon befallenen Stelle wieder auf. Bei 10 Patienten diese Gruppe konnten im weiteren Verlauf erneut t(14;18) positive Zellen nachgewiesen werden. In dieser Gruppe kam es bis jetzt zu 5 Rezidiven. Weitere 4 Rezidive waren in einer Gruppe zu sehen, die während ihrer gesamten Verlaufsuntersuchungen PCR-positiv blieben. Diese Ergebnisse zeigen, daß mit der Persistenz des PCR-Signals oder mit seinem Wiederauftreten die Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens sinkt. Von den 12 Rezidivpatienten erhielten 11 ein PCR-positives Transplantat, was die Frage nach dem Beitrag der reinfundierten Tumorzellen zum Rezidiv aufwirft. Brenner et al. [6] konnten zeigen, daß genetisch markierte Blasten im Rezidiv bei Kindern mit AML nachweisbar waren. Die Bedeutung reinfundierter Tumorzellen konnte auch von Gribben et al. [7] gezeigt werden, da Patienten mit follikulärem Lymphom, die ein t(14;18) posi-

ves KM-Transplantat erhalten hatten, eine schlechtere Prognose hatten nach Hochdosistherapie und autologer KM-Transplantation. Die lokalen Rezidive an den schon befallenen Stellen lassen dagegen den Schluß zu, daß ein Versagen der myeloablativen Therapie zum Wiederauftreten der Krankheit führt. Diese These wird auch von Johnson et al. [8] vertreten.

Sequentielle Hochdosistherapie und PBSC-Transplantation bei Patienten mit MM: Nachweis von Tumorzellen in den LP

Hochdosistherapien unter Einschluß alkylierender Substanzen wie Melphalan und Cyclophosphamid mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung werden auch zur Behandlung des MM vorgeschlagen, da konventionelle Therapien nur mittlere Überlebenszeiten von 2 bis 4 Jahren erbracht haben [9]. Die PBSC-Transplantation wurde hier zunehmend favorisiert, da das KM als stärker belastet mit Tumorzellen angesehen wurde. PCR-Analysen belegten aber auch hier, daß die PBSC-Transplantate mit Tumorzellen kontaminiert sind [10, 11, 12], wenn auch in einem geringeren Ausmaß als das KM [13]. Die PCR-Verfahren beruhen auf der hypervariablen CDR3 Region der schweren Ketten der Immunglobulingene, die für jede antikörperproduzierende Zelle einmalig ist, und deren klonale Vermehrung im Rahmen einer malignen B-Zellerkrankung nachgewiesen werden kann. Dazu wird die tumorspezifische CDR3-Region identifiziert und sequenziert, um anschließend ASO Primer ableiten zu können. Mit diesem patientenspezifischen PCR-Ansatz konnten in

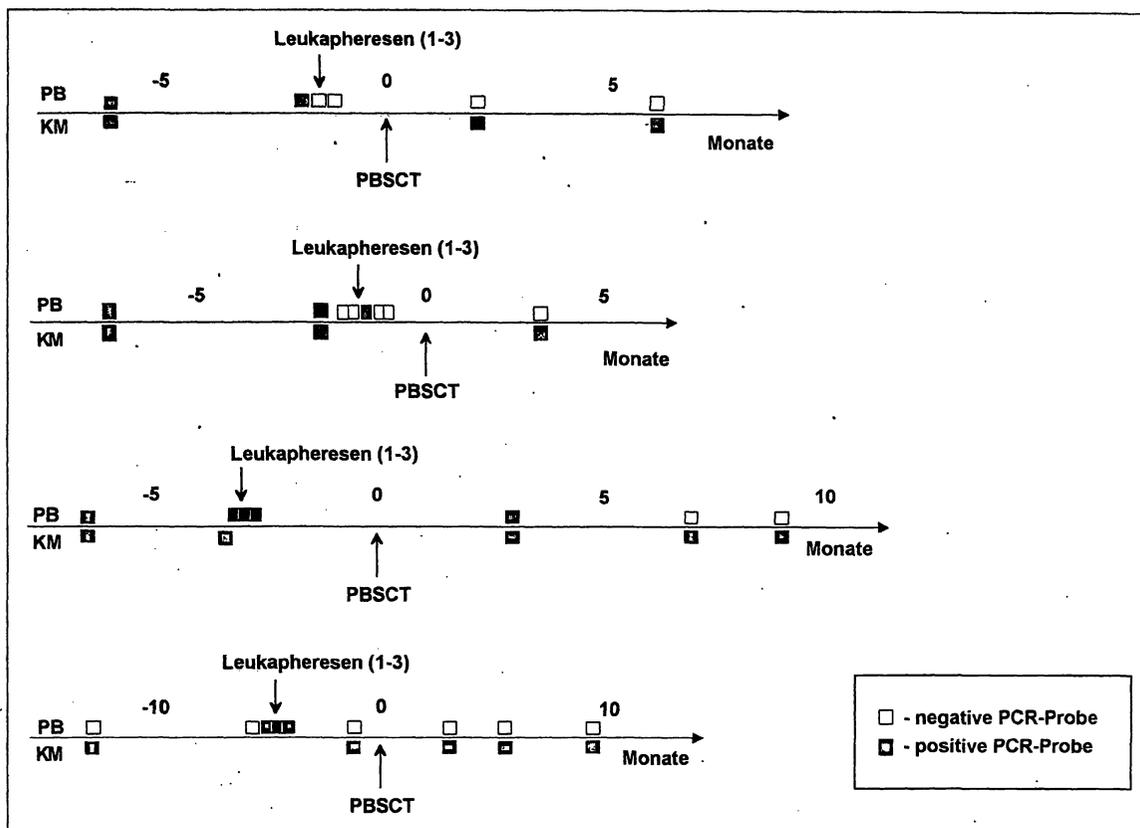


Abbildung 3 Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von Knochenmarks- (KM), peripheren Blut- (PB) und Leukapherese- (LP)-Proben von 4 Patienten mit multiplen Myelom nach G-CSF unterstützter Hochdosischemotherapie mit Cyclophosphamid. Dunkle Quadrate zeigen ein PCR-positives Ergebnis an, offene Quadrate ein PCR-negatives Ergebnis. Die PCR Ergebnisse wurden mit patientenspezifischen Primern gewonnen.

82% der untersuchten LP (55 von 67) Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 3). Auch in Patienten mit MM konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, daß reinfundierte Tumorzellen ursächlich mit dem Wiederauftreten der Krankheit in Verbindung stehen. Da das MM eine reife B-Zellerkrankung darstellt, sollten Anreicherungsverfahren wie die Selektion CD34+ Progenitorzellen möglich sein, um die Tumorzellzahl weiter zu reduzieren. Dennoch besteht eine gewisse Kontroverse, ob eine CD34+ Zelle schon das tumorspezifische Schwerkettenrearrangement aufweist. Wir sortierten dazu in einem experimentellen Ansatz mittels präoperativer Durchflußcytometrie hochreine CD34+ Fraktionen (im Median 98.2%) aus Aliquots PCR-positiver LP und führten mit diesen Fraktionen ASO-PCR Analysen durch. In keiner der CD34+ Fraktionen konnten wir das tumorspezifische Rearrangement nachweisen (Tab. 1), während die CD19+ Fraktionen ASO-PCR positiv waren. Dies zeigt, daß die CD34+ Zelle noch nicht in das maligne Geschehen involviert ist, somit die klinische Anwendung der CD34-Anreicherung

möglich ist. Dies wurde auch von *Vescio et al.* [14] gezeigt.

Hochdosiskonsolidierungstherapie mit Cytarabin bei Patienten mit AML der Subklasse M4Eo: Nachweis des Inversion 16 typischen Fusionstranscriptes in autologen Transplantaten unterschiedlicher Herkunft
 Mit der Identifizierung verschiedener spezifischer chromosomaler Veränderungen bei den einzelnen Subklassen der AML war es möglich, spezifische chromosomale Veränderungen mit unterschiedlichen klinischen Verläufen der Subklassen zu assoziieren [15]. So werden Patienten mit Veränderungen im Chromosom 11q32 einer Hochrisikogruppe zugeordnet, während Patienten mit einer t(8;21) Translokation in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit des krankheitsfreien Überlebens in die Niedrigrisikogruppe fallen. Mit der Identifizierung unterschiedlicher Risikogruppen konnten auch an das individuelle Risiko angepaßte Behandlungsverfahren entwickelt werden. Die Inversion 16 ist mit einer AML mit abnormalen Eosinophilen as-

Tabelle 1 Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion von Leukapheresefraktionen nach präparativer Durchflußzytometrie von Patienten mit Multiplem Myelom

Patient	Fraktion	Zellzahl	Reinheit	PCR-Ergebnis
1	CD34+	350.000	98,6%	negativ
	CD19+	20.000	93,5%	positiv
2	CD34+	25.000	96,9%	negativ
	CD19+	600.000	92,0%	positiv
3	CD34+	300.000	98,5%	negativ
	CD19+	600.000	91,7%	positiv
4	CD34+	250.000	98,0%	negativ
	CD19+	17.000	91,7%	positiv
5	CD34+	160.000	98,1%	negativ

Aliquots der Leukapheresen wurden nach dem Progenitorzellantigen CD34 und nach dem B-Zellantigen CD19 sortiert. Die PCR-Ergebnisse wurden mit Hilfe patientenspezifischer "complementarity determining region 3" (CDR3) Primer erzielt. Alle CD34+ Fraktionen waren PCR-negativ, während die CD19+ Fraktionen PCR-positiv waren.

Tabelle 2 Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) von Aliquots der Leukapheresen und des Knochenmarks vor und nach „Purging“ von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie der Subklasse M4Eo

Patient	Leukapheresen			„Purged“ Knochenmark	
	1	2	3	vorher	nachher
1	- +	- +	- +	++	++
2	- +	-(+)	-(+)		
3	- +	- +*		++	++
4	--	--*		(+)+	(+)+
5	- +	- +	- +		

* Die Patienten erhielten die Leukapheresen im Rahmen ihrer Rezidivtherapie

++ = PCR+ bereits nach einer Amplifikationsrunde
 -+ = PCR+ nach zwei Amplifikationsrunden
 -- = PCR- nach zwei Amplifikationsrunden
 (+)+ = PCR+ bereits nach einer Amplifikationsrunde aber nur nach Hybridisierung
 -(+) = PCR+ nach zwei Amplifikationsrunden aber nur nach Hybridisierung

soziiert (AML FAB M4Eo). Diese Subklasse ist charakterisiert durch hohe komplette Remissionsraten mit langer Dauer. Kürzlich wurde gezeigt, daß auch Leukämien mit Inversion 16 von einer Behandlung mit Hochdosis-Cytarabin profitieren können [16]. Die Inversion 16 resultiert in einem Fusionsprotein bestehend aus dem CBF β Gen des langen Arms des Chromosoms 16 und dem MYH11 Gen des kurzen Arms,

dessen mRNA im Rahmen eines RT-PCR Ansatzes nachgewiesen werden kann. Im Rahmen des Studienprotokolles werden von diesen Patienten auch Stammzellen aus der Peripherie und aus dem Knochenmark gewonnen. Wie in Tab. 2 zu sehen, sind bei 3 untersuchten Patienten die KM-Transplantate schon nach einer Amplifikationsrunde PCR-positiv, während die peripheren Transplantate von 5 Patientern erst nach zwei Amplifikationsrunden PCR-positiv werden, bzw. in einem Fall keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten. Im Rahmen ihrer Rezidivtherapie erhielten folglich 2 Patienten auch dann ihr PBSC-Transplantat. Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe dieses PCR-Ansatzes Aussagen über die Tumorzellkontamination von autologen Stammzelltransplantaten unterschiedlicher Herkunft möglich sind, die zu klinischen Konsequenzen führen können.

Diskussion

Die Frage, ob Tumorzellen auch mit molekularbiologischen Techniken nicht mehr nachweisbar sein sollten, um maligne Hämoblastosen heilen zu können, ist derzeit unbeantwortet. Bei den in dieser Studie vorgelegten Krankheitsentitäten konnte für die niedrig und intermediär malignen Lymphome gezeigt werden, daß ein PCR-positives Transplantat mit einer erhöhten Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht [7]. Auf der anderen Seite konnten t(14;18) positive Zellen in Patienten aller Stadien in klinischer Remission nachgewiesen werden [17, 18], was andeutet, daß in Abhängigkeit von der Biologie der Erkrankung eine bestimmte Anzahl Tumorzellen vom Immunsystem kontrolliert werden könnte. Eine solche Möglichkeit könnte durchaus auch für das MM in Betracht kommen. Studien, die lang anhaltende Remissionen trotz molekularbiologisch nachgewiesener Tumorzellen belegen, sind derzeit nicht publiziert. Weitere Dosisintensivierungsprogramme wie Doppeltransplantationen beschreiben für das MM jetzt aber erstmalig das Erreichen von molekularen Remissionen [19]. Mit kurzen Verlaufszeiten konnte für Leukämien mit Inversion 16 dagegen gezeigt werden, daß komplette Remissionen in Anwesenheit von Tumorzellen erzielt werden können [20]. Diese Befunde belegen, daß unter Beachtung der jeweiligen Biologie der Erkrankung weitere Studien mit größeren Patientenzahlen und längeren Verlaufszeiten notwendig sind, um die prognostische Aussagekraft von PCR-Befunden abschließend bewerten zu können.

Literatur

- 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. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1527-32.
- Bakshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer S. Cloning the chromosomal breakpoint of

- t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on chromosome 18. *Cell* 1985; 41: 889-906.
3. Chomeczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
 4. Yamada M, Hudson S, Tournay O, Bittenbender S, Shane SS, Lange B, Tsujimoto Y, Caton AJ, Rovera G. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 86: 5123-7.
 5. Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS. Fusion between transcription factor CBF β /PEBP2 β and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993; 261: 1041-4.
 6. Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro J, Anderson WF, Ihle JN. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-91.
 7. Gribben JG, Neuberger D, Freedman AS, Gimmi CD, Pesek KW, Barber M, Saporito L, Woo SD, Coral F, Spector N, Rabinowe SN, Grossbard ML, Ritz J, Nadler LM. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-57.
 8. Johnson PWM, Price CGA, Smith T, Cotter F, Meerabux J, Rohatiner A, Young B, Lister T. Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 798-805.
 9. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994; 330: 484-9.
 10. Billadeau D, Quam L, Thomas W, Kay N, Greipp P, Kyle R, Oken MM, Van Ness B. Detection and quantitation of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood* 1992; 80: 1818-24.
 11. Mariette S, Femand P, Brouet JC. Myeloma cell contamination of peripheral blood stem cell grafts in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 47-52.
 12. Bird JM, Blixham D, Samson D, Marcus RE, Russell NH, Kelsey SM, Newland AC, Apperley JF. Molecular detection of clonally rearranged cells in peripheral blood progenitor cell harvests from multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 1994; 88: 110-6.
 13. Vescio RA, Han EJ, Schiller GJ, Lee JC, Wu CH, Cao J, Shin J, Kim A, Lichtenstein AK, Berenson JR. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 103-10.
 14. Vescio RA, Hong CH, Cao J, Kim A, Schiller GJ, Lichtenstein AK, Berenson RJ, Berenson JR. The hematopoietic stem cell antigen, CD34; is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. *Blood* 1994; 84: 3283-90.
 15. Bloomfield CD. Prognostic factors for selecting curative therapy for adult myeloid leukemia. *Leukemia* 1992; 6 (suppl 4): 65-7.
 16. Mayer RI, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Frei E. Comparative evaluation of intensive post-remission therapy with different dose schedules of Ara-C in adults with acute myeloid leukemia (AML): initial results of a CALGB phase III study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1992; 11: 853-9.
 17. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LCJ, Van't Veer MB. Translocation (14;18)-positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localised (stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993; 82: 2510-6.
 18. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LCJ, Van't Veer MB. Clinical significance of t(14;18)-positive cells in the circulation of patients with stage III or IV follicular non-Hodgkin's lymphoma during first remission. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1541-6.
 19. Björkstrand B, Ljungman P, Bird JM, Samson D, Gahrton G. Double high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation can induce molecular remissions in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 367-71.
 20. Hebert J, Cayuela JM, Daniel MT, Berger R, Sigaux F. Detection of minimal residual disease in acute myelomonocytic leukemia with abnormal marrow eosinophils by nested polymerase chain reaction with allele specific amplification. *Blood* 1994; 84: 2291-6.