

Diagnostik der minimalen Resterkrankung bei Leukämien durch Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Real-time Fluorescence PCR to Monitor Minimal Residual Disease in Leukemias

A. Bohn¹, U. Lass¹, K. A. Kreuzer¹, H. Oettle¹, C. A. Schmidt^{1,2}

Zusammenfassung: Die Diagnose der minimalen Resterkrankung (MRD) bei Leukämien wurde in der Vergangenheit fast ausschließlich durch den qualitativen Nachweis residueller Tumorzellen erbracht. Neue molekulare Verfahren wie die (RT)-PCR erlauben mit hoher Sensitivität den Nachweis erkrankungsspezifischer Nukleinsäuren. Trotz ihrer vielen Vorteile, wie Sensitivität und Spezifität, erlaubt die PCR über lange Zeit nicht die Quantifizierung der nach Behandlung verbleibenden Tumorzellen bzw. deren charakteristische Transkripte. Daß die Menge dieser Restzellen jedoch von großer klinischer Bedeutung ist, konnte durch Untersuchungen gezeigt werden, die sich quantitativer kompetitiver PCR-Techniken bedienen. Diese Techniken besitzen jedoch den Nachteil, daß sie in ihrer Durchführung zeitlich und methodisch verhältnismäßig aufwendig sind. Aus diesem Grunde sind bislang Verfahren zur quantitativen MRD-Diagnostik nur selten im Laborrepertoire zu finden.

Seit einiger Zeit sind nun zwei Geräte verfügbar (ABI PRISM 7700 SDSTM, LightCyclerTM), die die quantitative PCR-Diagnostik ausgesprochen verlässlich, einfach und schnell durchführen lassen. Beide Technologien beruhen auf dem Prinzip, daß während der PCR-Reaktion die Amplifikation der Zielsequenz über eine Fluoreszenz-Messung detektiert wird. Aus den so generierten Meßpunkten können genaue Informationen über die jeweilige Reaktionskinetik gewonnen werden, was schließlich die exakte Quantifizierung der ursprünglichen Transkriptzahl erlaubt.

Wir stellen die beiden zur Zeit hierfür verfügbaren Geräte und deren gebräuchliche Fluoreszenz-Formate vor. Schließlich stellen wir anhand der bislang von uns und anderen durchgeführten Untersuchungen die klinische Bedeutung dieser Technik bei der Diagnostik der MRD vor.

Schlüsselwörter: Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion/Methodik; Fluoreszenzfarbstoffe; Leukämie, chronisch myeloische/Genetik; Fusionsproteine, bcr-abl/Analytik; Neoplasmen, residuelle.

Summary: Diagnosis of minimal residual disease (MRD) of leukemias is based on qualitative detection of residual tumor cells. Newer molecular methods, like reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), allow the reliable detection of disease-specific nucleic acids and are useful in monitoring MRD. However despite many advantages like sensitivity and specificity, PCR does not allow quantification of residual tumor cells, i.e. their characteristic transcripts. Quantitative competitive PCR results showed that the amount of remnant tumor cells is of clinical importance. Disadvantages of these techniques are that their implementation is time consuming, costly and fault-prone. Two new technologies are now available (ABI PRISM 7700 SDSTM, LightCyclerTM), which allow reliable, facile and fast quantitative PCR analysis. Both technologies are based on the principle that during a PCR reaction the amplification of the target sequence is linked to fluorescence detection. Precise reaction kinetics information can be generated from this data, which finally allows exact quantification of the original transcript numbers. Here we describe both instruments. Furthermore we describe fluorescence formats, their advantages and potential pitfalls. Finally we consider the clinical relevance of these techniques for the diagnostic of MRD in relation to our results and those of other investigators.

Keywords: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction/methods; Fluorescent Dyes; Leukemia, Myeloid, Chronic/genetics; Fusion Proteins, bcr-abl/analysis; Neoplasm, Residual.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) [1, 2] ist ein in der Diagnostik und Forschung häufig eingesetztes Verfahren zum spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren. Sie wird in der Hämatologie zur Diagnostik von verbleibenden Tumorzellen bzw. deren charakteristischen Transkripten, verwandt. Definitionsgemäß haben Patienten in klinischer Remission, bei denen durch sehr sensitive Methoden die Erkrankung weiterhin nachweisbar bleibt, eine minimale Resterkrankung

¹Abteilung für Innere Medizin und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

²Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Andreas Schmidt, Abteilung für Innere Medizin und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie u. Onkologie, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Forum 4, R.1.0310, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin. Fax: +49-30-450-53929; E-mail: christian.schmidt@charite.de
Eingegangen: 13. Oktober 1999/Angenommen 27. Dezember 1999

(minimal residual disease, MRD) [3]. Das Ziel der MRD-Diagnostik [4] besteht in der Entwicklung von Anhaltspunkten, anhand derer man den Nutzen einer Reduktion oder Intensivierung der Therapie für den einzelnen Patienten abschätzen kann.

So entwickeln etwa 30% der Kinder, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkranken, nach Tumorbehandlung ein Rezidiv. In einer großen, multizentrischen Studie [5] von 1989 bis 1996 untersuchte man prospektiv 246 an ALL erkrankte Kinder auf das Vorhandensein und das Niveau einer residuellen Erkrankung. Als klonale Marker der leukämischen Blasten wurden T-Zell-Rezeptor- oder Immunglobulin-Gene benutzt und mittels kompetitiver PCR mengenmäßig in Knochenmarkproben bestimmt. Alle Patienten sind mit einem einheitlichen Therapieprotokoll behandelt worden. Das Ergebnis der Studie war, daß Patienten, die am Ende der Induktionstherapie 2×10^3 und mehr residuelle leukämische Zellen in 2×10^5 mononukleären Knochenmarkzellen aufwiesen, ein deutlich erhöhtes Risiko für ein Rezidiv aufwiesen. Darüber hinaus konnten die Patienten durch die Quantifizierung der residuellen Zellen in Gruppen mit unterschiedlichem Rezidivrisiko eingeordnet werden. Diese Definition von Schwellenwerten macht die Überlegenheit quantitativer gegenüber qualitativen PCR-Daten deutlich.

Bei Diagnosestellung einer chronisch myeloische Leukämie (CML) ist in 90% der Fälle das Philadelphia-Chromosom nachweisbar [6]. Dem Philadelphia-Chromosom (t (9;22)(q34;q11)) liegt auf molekularer Ebene die Fusion des bcr- und abl-Gens zugrunde. Eine Knochenmarktransplantation (KMT), Gabe von Interferon- α (IFN- α) und Hydroxyurea stellen die Behandlungsmöglichkeiten dar, mit denen CML-Patienten die längsten Überlebensraten erreichen. 80% der Patienten nach KMT befinden sich in klinischer Remission und sind bcr/abl negativ, während unter IFN- α -Therapie diese Transkripte weiterhin nachzuweisen sind [7]. Die Bedeutung der PCR-Ergebnisse für die Voraussage eines Rezidives bleibt aber unklar [8]. Hughes et al. [9] stellten 1991 eine Untersuchung von 37 CML-Patienten nach KMT in Remission vor. Die Daten wurden durch nested PCR gewonnen und ergaben, daß PCR-Positivität in den ersten 6 Monaten nach KMT kein erhöhtes Rezidivrisiko für den einzelnen Patienten bedeutet, ein Persistieren über diesen Zeitpunkt hinaus aber mit einer erhöhten Rezidivrate einhergeht. Zwei Jahre später konnten Miyamura et al. [10] mit der gleichen Methode bei 64 Patienten keinen Zusammenhang zwischen PCR-Positivität und Rezidivrisiko feststellen. Lin et al. [11] zeigten, daß Menge und Verlaufskinetik des bcr/abl-Fusionsgens als Marker für

die Rezidiverkennung nach KMT prinzipiell geeignet sind. Sie gingen anders vor und quantifizierten bcr/abl-Transkripte mittels kompetitiver PCR. In einem Kollektiv von 98 Patienten korrelierte nach einer KMT die Expression der bcr/abl-spezifischen mRNA signifikant mit dem Rezidivrisiko.

In der PCR wird eine definierte DNA-Sequenz durch eine thermostabile DNA-Polymerase vermehrt. Initial werden die DNA-Stränge durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Nach Abkühlen binden sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) an den beiden Einzelsträngen, die die Zielsequenz flankieren. In einem nächsten Schritt werden diese Primer durch die DNA-Polymerase verlängert. Der Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden und führt zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz. Unter anderem der Verbrauch der Primer, der Nukleotide und die abnehmende Aktivität der DNA-Polymerase verhindern nach circa 35-40 Zyklen die exponentielle Vermehrung und bewirken eine Sättigungskinetik. Daher kann von der entstandenen cDNA-Menge nicht auf die ursprüngliche Menge der Zielsequenz rückgeschlossen werden. Modifikationen wie die nested PCR (Einsatz eines zweiten Primerpaares innerhalb der Sequenz des ersten) führen zu einer maßgeblichen Erhöhung von Spezifität und Sensitivität. Die Sensitivität bewegt sich dann in einem Größenbereich, bei dem eine für die Zielsequenz positive Zelle in 10^6 negativen Zellen zu einem nachweisbaren Signal führt. RNA wird der Analyse durch die PCR zugänglich, wenn man mit Hilfe der reversen Transkription einen komplementären Strang synthetisiert (RT-PCR).

Alle quantitativ kompetitiven PCR-Methoden haben gemeinsam, daß es sich um Endpunktmessungen handelt. Im Folgenden wird kurz eine Möglichkeit vorgestellt, mit der kompetitiven PCR zu quantifizieren: Der Probe wird zusätzlich eine Sequenz bekannter Konzentration beigelegt. Dieses Kompetitoramplikon wird mit den gleichen Primern und der gleichen Effizienz wie die gesuchte Zielsequenz amplifiziert, hat aber eine unterschiedliche Basenlänge. Der Kompetitor wird in verschiedenen Konzentrationen in der PCR eingesetzt, um den Äquivalenzpunkt der bekannten mit der unbekanntem Sequenz zu bestimmen. Die PCR sollte dabei aus dem oben genannten Grund (Sättigungskinetik) in der exponentiellen Vermehrungsphase beendet werden. Nach Gelelektrophorese und Darstellung mit Ethidiumbromid im UV-Licht werden die DNA-Banden nach ihrer optischen Dichte vermessen. Jetzt können die densitometrischen Werte der bekannten Konzentrationen benutzt werden, um die unbekanntem zu berechnen. Diese Technik besitzen den Nachteil, daß sie in ihrer Durchführung zeitlich und methodisch aufwendig ist, was ihren Einsatz und ihre Verbreitung begrenzt hat.

In den letzten 4 Jahren sind PCR-Methoden entwickelt worden, die auf der Quantifizierung mittels Fluoreszenzdetektion basieren. Das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und der Light-

Nicht standardisierte Abkürzungen: ALL, akute lymphatische Leukämie; CCD, charge-coupled device; CML, chronisch myeloische Leukämie; DLI, Donor-Lymphozyten-Infusions-(Therapie); FAM, fluorescein phosphoramidite; FRET, Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer; IFN, Interferon; KMT, Knochenmarktransplantation; MRD, minimal residual disease; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcriptase; TAMRA, Tetramethyl-Rhodamin.

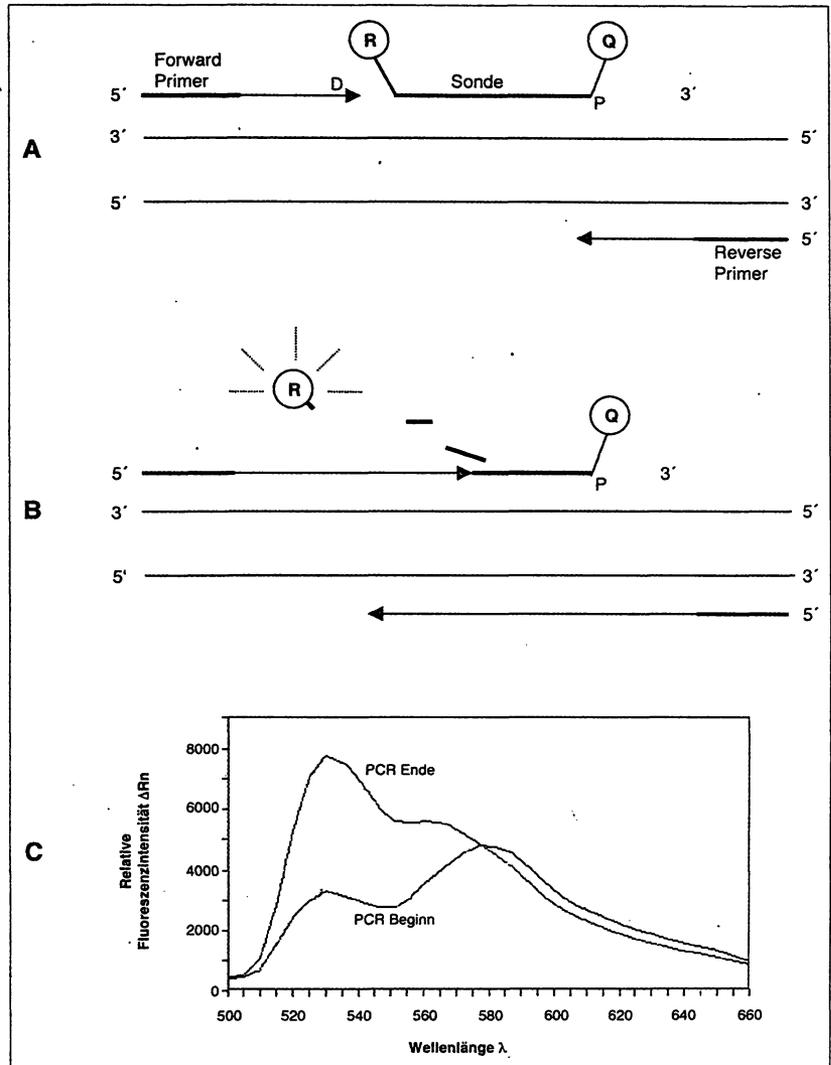


Abbildung 1 TaqMan-Format.
 R=Reporter, Q=Quencher, P=Phosphatgruppe, D=DNA-Polymerase
 A) Die Bindung des Reporterfarbstoffes an die Sonde unterdrückt seine Fluoreszenzemission, da durch die hohe räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer stattfindet.
 B) Nachdem durch die DNA-Polymerase die Sonde gespalten worden ist, kann der Reporterfarbstoff meßbar zur Fluoreszenz angeregt werden.
 C) Die Fluoreszenzemission einer Probe zum Anfang und Ende einer TaqMan-PCR. Das erste Emissionsmaximum bei ca. 530 nm wird durch den Reporterfarbstoff FAM, das zweite bei ca. 580 nm durch den Quencher TAMRA verursacht. Nach Ablauf der PCR ist die Fluoreszenzintensität durch den Sondenumsatz im ersten Emissionsmaximum (530 nm) angestiegen.

Cycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sind die beiden zur Zeit auf dem Markt erhältlichen Geräte.

Technik der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Grundsätzlich läuft eine Echtzeit-Fluoreszenz-PCR so ab, daß an die Reaktion eine Änderung des Fluoreszenzverhaltens der Probe gekoppelt ist, die in jedem Zyklus gemessen wird. Der 5'-Nukleaseassay (TaqMan®-Format) basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase [12-14]. Sie spaltet bei der Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung eine doppelt fluoreszenzmarkierte Sonde (Abb. 1). Die Sonde selbst kann durch die Polymerase nicht verlän-

gert werden, da dies durch eine Phosphatgruppe am 3'-Ende verhindert wird. Sie trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (z.B. 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA), zwischen denen ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfindet. Dieser FRET bewirkt eine Übertragung der Anregungszustände von Elektronen eines Fluorophors auf ein zweites, dies aber nur bei hoher räumlicher Nähe (10-100 Å). D.h.: die Bindung an die intakte Sonde unterdrückt die Fluoreszenzemission des Reporters durch eine Übertragung auf den Quencher. Wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase gespalten, steigt die Fluoreszenz im Emissionsmaximum des Reporters an. Die Fluoreszenzänderung ist dabei aufgrund der spezifi-

sehen Hybridisierung an die Zielsequenz proportional zu deren Amplifikation.

Beim HybProbe®-Format (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) werden zwei Fluoreszenzsonden eingesetzt, die gewöhnlich mit einer Base Abstand innerhalb der Zielsequenz hybridisieren (Abb. 2). An die erste Sonde ist am 3'-Ende ein Donorfluorophor (z.B. FAM), an die zweite am 5'-Ende ein Reporterfluorophor (z.B. LC Red 640: $\lambda=640$ nm) gekoppelt. Durch den FRET führt eine Anregung des Donors zu einer Verstärkung der Fluoreszenz des Akzeptors, die pro PCR-Zyklus gemessen wird.

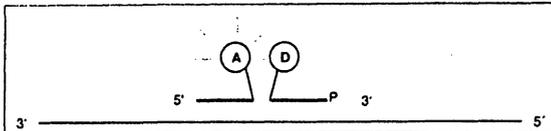


Abbildung 2 HybProbe-Format.

A=Akzeptorfluorophor, D=Donorfluorophor, P=Phosphatgruppe. Hybridisieren beide Sonden auf einem DNA-Einzelstrang nebeneinander, so führt die Anregung des Donorfarbstoffes durch einen FRET zu einer verstärkten Fluoreszenzemission des Akzeptors. Mit steigender Kopienzahl innerhalb der PCR erhöht sich somit die Fluoreszenzintensität im Emissionsmaximum des Akzeptors.

SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, USA) ist, ähnlich wie Ethidiumbromid, ein mit doppelsträngiger DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Eine vermehrte DNA-Menge führt daher zu einer erhöhten Einlagerung des Farbstoffes und zu einem erhöhtem Fluoreszenzsignal. Die Sequenzspezifität, die durch eine Sonde hervorgerufen wird, ist bei SYBR Green I nicht gegeben. Deshalb wird durch eine anschließende Schmelzpunktanalyse geklärt, welche PCR-Produkte entstanden sind. Die Doppelbindungen der DNA-Stränge werden aufgelöst, indem die Temperatur langsam um 0,2 °C/Sekunde erhöht wird. Alle 0,2 Sekunden wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Mit zunehmender Erwärmung zeigt ein signifikanter Abfall der Fluoreszenz die Temperatur an, bei der die in der Probe enthaltenen DNA denaturiert. Diese Temperatur ist spezifisch für die in der Reaktion entstandenen PCR-Produkte, und kann so zur Trennung zwischen dem gewünschten Produkt und z.B. Amplifikaten, die durch eine Zusammenlagerung der Primer entstanden sind, eingesetzt werden.

ABI PRISM 7700 Sequence Detector™

Im ABI PRISM 7700 Sequence Detector™ mißt eine CCD-Kamera (charge-coupled device camera) die Fluoreszenzemission pro PCR-Zyklus über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 660 nm. Das Fluoreszenzsignal wird der Kamera über Glasfaserkabel von 96 Probengefäßen zugeführt. Die Proben sind dabei mit einer durchsichtigen Abdeckung verschlossen, so daß Kontaminationen minimiert werden. Der Betrag der emittierten Fluoreszenz in den ersten 15 Zyklen wird

vom Reporterfluoreszenzsignal abgezogen, und somit die Signale aller Proben auf ein Ausgangsniveau gebracht. In einem Diagramm wird das Fluoreszenzsignal (Ordinate) gegen die Zykluszahl (Abszisse) aufgetragen (Abb. 3A). Das Sondensignal wird dann diskriminiert, wenn es auf den 10fachen Wert der Standardabweichung oberhalb der Ausgangsfluoreszenz ansteigt. Der Zyklus, in dem dieser erste signifikante Anstieg geschieht, ist als Schwellenzyklus (threshold cycle, C_T -Wert) definiert. Der C_T -Wert steht in Beziehung zur Ausgangstranskriptmenge und stellt einen verlässlichen Parameter zur Quantifizierung dar. Um eine unbekannte cDNA-Menge zu bestimmen, werden Proben bekannter Ausgangstemplatzzahl in einer Verdünnungsreihe eingesetzt. Üblich ist die Verdünnung in logarithmischen Stufen von 10^7 bis 10^0 cDNA-Kopien. Wie in der Abbildung 3B dargestellt, werden für Proben mit bekannter Ausgangstemplatzzahl die C_T -Werte aufgetragen und durch diese Punkte eine Ausgleichsgerade gelegt. Diese Standardgerade ermöglicht die Bestimmung der Ausgangstemplatzzahl in den unbekanntenen Proben durch deren C_T -Werte.

LightCycler™

Der LightCycler™ ist ein Mikrovolumenfluorimeter mit der Möglichkeit zu einem schnellen Temperaturwechsel bei gleichzeitiger Fluoreszenzmessung [15-17]. Gewöhnlich dauert ein PCR-Lauf mit Auswertung weniger als eine Stunde. Probe und Reaktionsmix werden in dünne Glaskapillaren gegeben. Die Glaskapillaren ermöglichen einen raschen Temperaturangleich der Probe an die Umgebungstemperatur und die Anregung bzw. Detektion eines Fluoreszenzsignals. Sie werden in einem 32-Loch-Rotor positioniert, auf dem die Proben einzeln an die Anregungs- und Detektionsvorrichtung gefahren werden. Die Fluoreszenz wird dann durch eine Blaulicht emittierende Diode angeregt und mittels einer Silikonphotodiode detektiert. Erhitzte Luft wird mit einem Ventilator gleichmäßig im Cycler verteilt, die Kühlung erfolgt durch den Ventilator alleine, der die heißen Luftmassen aus dem Gerät bläst. So lassen sich Temperaturänderungen von bis zu 20 °C pro Sekunde erreichen, was eine stringente Einstellung der Temperaturbedingungen innerhalb der PCR erlaubt. Dadurch minimiert sich u.a. die Entstehung von unspezifischen Amplifikaten. Die quantitative Analyse erfolgt in 3 Schritten, nämlich der Angleichung der Ausgangsfluoreszenzsignale der einzelnen Proben, die Trennung der Fluoreszenzsignale der logarithmischen Amplifikationsphase von der Hintergrundfluoreszenz und die Analyse dieser Phase zur Quantifizierung. Dabei bietet die LCDA Software des LightCyclers für jeden Schritt mehrere Auswertungsmodi an. Dies trägt dem Einsatz von verschiedenen Fluoreszenzformaten Rechnung. Damit hat der Benutzer einen größeren Einfluß auf die Datenauswertung als beim ABI PRISM 7700 SDS. Letztendlich wird auch hier mit Hilfe von Proben bekannter Konzentration die Ausgangskopienzahl in den unbekanntenen Proben errechnet.

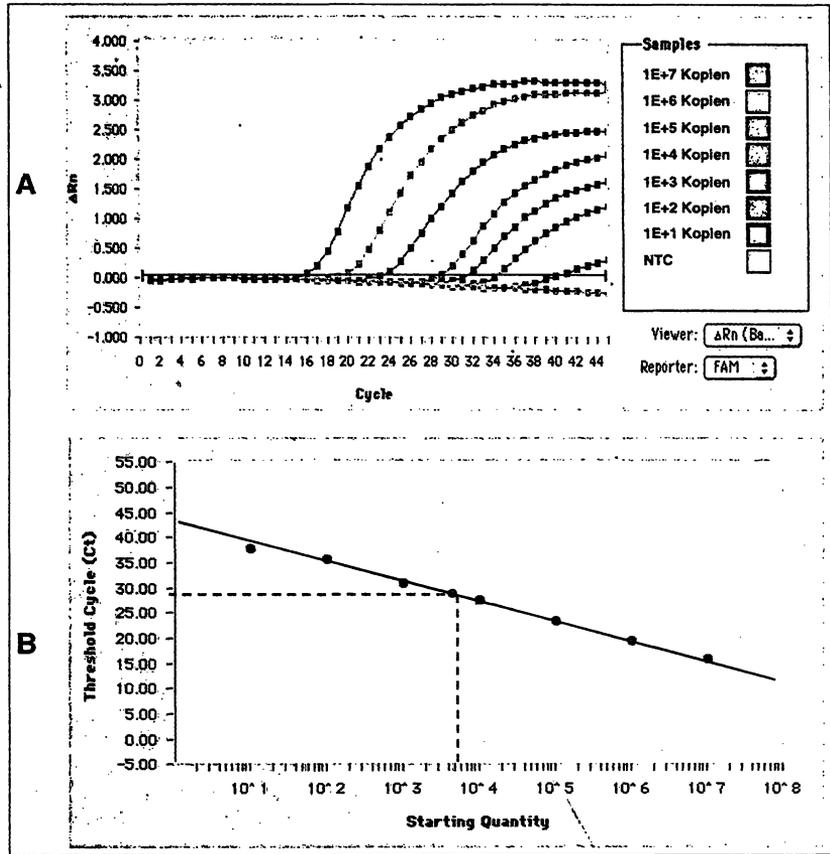


Abbildung 3 Auswertung der Fluoreszenzdaten auf dem ABI PRISM 7700 SDS. ΔRn =relative Fluoreszenzintensität.

Gemessen wurden 7 Proben mit 10^7 bis 10^1 Kopien (in logarithmischen Verdünnungsstufen) einer Sequenz des bcr/abl-Fusionsgens. NTC=non template control (Probe ohne Zielsequenz).

A) Amplifikationsdiagramm. Der Schnittpunkt der Amplifikationskurven mit der schwarzen Geraden markiert den jeweiligen C_T -Wert.

B) Standardgerade. Durch die Punkte [C_T -Wert/ Ausgangstemplatzahl] der bekannten Proben wird eine Ausgleichsgerade gelegt. Die Ausgangstemplatzahl einer unbekannt Probe wird durch deren C_T -Wert anhand der Ausgleichsgeraden errechnet. Die unterbrochenen Hilfslinien sind eingefügt.

Vor- und Nachteile der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Zweifellos sind Ergebnisse, die auf der PCR beruhen, grundsätzlich kritisch zu betrachten [18-20]. Dieses Verfahren birgt eine hohe Gefahr von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen, die auf Kontamination, inadäquatem Probenvolumen, fehlerhafter Probenaufarbeitung und einer Degradierung der Zielsequenz beruhen können. Hauptausgangspunkt für mögliche Kontaminationen sind die PCR-Produkte, die in hoher Konzentration am Ende eines PCR-Laufes vorliegen und zur weiteren Analyse bearbeitet werden. Bei den hier dargestellten Verfahren zur Echtzeit-Fluoreszenz-PCR ist eine weitere Bearbeitung der Proben nach der Messung überflüssig, so daß diese Quelle der Kontamination nicht besteht.

Bisher gibt es keine einheitlichen Vorgaben, um mit der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR zu quantifizieren. Insbesondere die Frage, welches Referenzgen eingesetzt werden sollte, ist strittig. Die quantitative Bestimmung einer Zielsequenz ist aber nur aussagekräftig, wenn man zusätzlich die Menge eines Referenzgenes mit einbezieht. Als Referenzgene wurden Sequenzen von

β -Aktin [21], Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase [22] und Glukose-6-phosphatdehydrogenase [23] vorgeschlagen. Referenzgene sind Homöostasegene, die konstant in einer Zelle vorhanden sind und nicht vom Krankheitsgeschehen beeinflusst werden sollten. Durch ihre quantitative Bestimmung erhält man einen Einblick, ob eine ausreichende Menge cDNA von guter Qualität vorhanden war. Denn auch aufgearbeitete cDNA kann degradieren, z.B. durch unsachgemäße Lagerung oder beim Einfrieren und Auftauen der Probe. Weiterhin können Inhibitoren der Taq DNA-Polymerase (z. B. Hämoglobin) zu einer fehlerhaften Quantifizierung führen. Um unterschiedliche Proben (z.B. bei der Verlaufskontrolle eines Patienten) miteinander zu vergleichen, hat es sich als sinnvoll erwiesen, den Quotienten aus der Zielsequenzmenge und der Menge des Referenzgenes zu bilden (ratio).

Damit im TaqMan-Format die Verlängerung der Primer ohne eine Sondenspaltung verhindert wird, sollte der Schmelzpunkt der Fluoreszenzsonde um ca. 5°C über dem der Primer liegen. Weiterhin ist die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase von entscheidender Bedeutung für eine suffiziente Spaltung der Sonde, wobei sich diese Enzymaktivität bei Taq

DNA-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller gravierend unterscheidet [24].

Im HybProbe-Format kann das Sondendesign Schwierigkeiten bereiten. Beide Sonden müssen ungefähr je 25 Basen abdecken, nahe beieinander hybridisieren und ungefähr den gleichen Schmelzpunkt haben. Es kann also durchaus problematisch sein, all diese Kriterien zu erfüllen.

Im Hinblick auf einen Einsatz in der Routinediagnostik mit einem hohen Probenaufkommen erscheint der ABI PRISM 7700 SDS im Gegensatz zum Light-Cycler durch das 96-well-Format und einen einheitlichen Auswertungsmodus geeigneter. Die Stärke des LightCyclers liegt in der kurzen Dauer für einen PCR-Lauf. Damit ist er für experimentelle Ansätze sehr gut geeignet oder für einen Einsatz in der Diagnostik mit kleinem Probenaufkommen, z.B. in der ALL-Diagnostik mit patientenspezifischen Proben.

MRD-Diagnostik mittels Echtzeit-Fluoreszenz-PCR

Pongers-Willemsse et al. [25] verglichen die Sensitivität der Echtzeit-Fluoreszenz-PCR im TaqMan-Format mit zwei anderen, in der MRD-Diagnostik der ALL, gebräuchlichen Verfahren. Diese benutzen im Anschluß an die PCR eine patientenspezifische, radioaktiv markierte Sonde. Bei der dot-blot-Methode wird das PCR-Produkt nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht, oder beim liquid-hybridization-Verfahren in eine Flüssigkeit gegeben. Die Menge der Zielsequenz wird dann über eine Anreicherung der Radioaktivität durch die Sonde bestimmt. Ihre Daten zeigen, daß die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR eine exakte Bestimmung des MRD-Niveaus in Knochenmarkszellen erlaubt. Die dot-blot-Methode wies eine gleiche, oder 10-fach höhere Sensitivität auf und das liquid-hybridization-Verfahren war 10 bis 100fach sensitiver. Trotzdem stellte sich die fluoreszenzbasierte Methode als eine echte Verbesserung heraus, da der Umgang mit Radioaktivität problembehaftet ist.

In der Abbildung 4 stellen wir den Verlauf von 4 CML-Patienten mit allogener KMT vor, deren bcr-abl-Transkripte bestimmt worden sind. Aus dem peripheren Blut dieser Patienten wurde nach der Guanidinium-Isothiocyanat-Phenol-Methode [26] RNA isoliert. Nach Messung der optischen Dichte wurden je 1000 ng RNA durch eine RT in cDNA umgeschrieben und davon 100 ng in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die Messungen der bcr/abl Transkripte erfolgte auf dem ABI PRISM 7700 SDS, als Referenzgen wurde β -Aktin benutzt. Wie man im in der Abbildung 4 sehen kann, sinkt die ratio [bcr/abl - β -Aktin] rasch nach KMT ab und steigt mit der Entwicklung eines Rezidivs wieder an. Daraufhin wurden die Patienten durch eine Donor-Lymphozyten-Infusions-Therapie (DLI) [27] behandelt, was sich in einem Abfall der ratio niederschlägt. Die Daten decken sich mit denen von Mensink et al. [28] und Eder et al. [29].

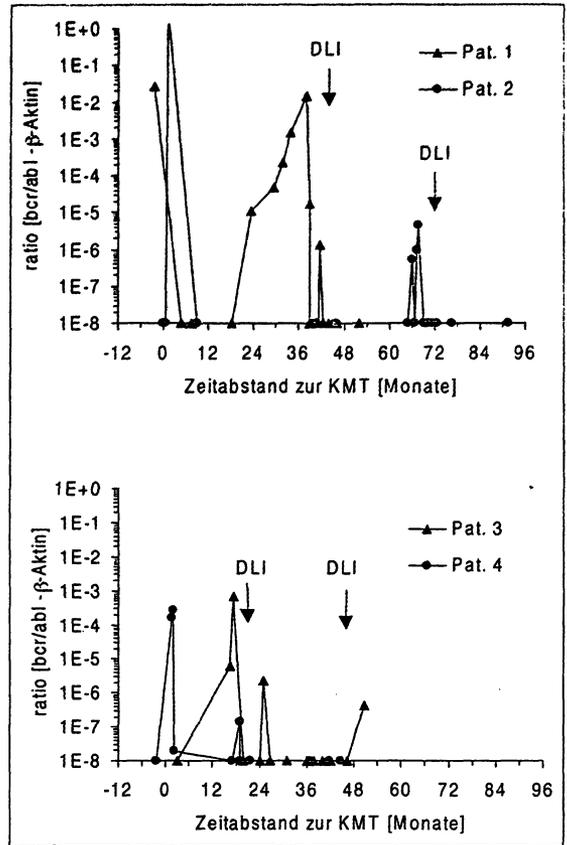


Abbildung 4 Patientenverläufe. DLI=Donor-Lymphozyten-Infusion, KMT=Knochenmarkstransplantation, ratio=Quotient aus bcr/abl- und β -Aktin-Transkriptzahl. Proben von vier CML-Patienten sind retrospektiv untersucht worden. Alle Patienten erhielten eine allogene KMT und dann aufgrund eines Rezidivs eine DLI-Therapie.

Ausblick

Die hier dargestellten fluoreszenz-basierten quantitativen PCR Techniken stellen einen deutlichen Fortschritt in der Diagnostik und der Überwachung von Neoplasien mit molekularen Markern dar. Dies gilt beispielsweise für die CML, bei der nach KMT die Kinetik der zunehmenden oder abnehmenden bcr/abl Transkripte eine Einschätzung der Situation erlaubt, die bislang nicht möglich war. Um einen Vergleich der Daten verschiedener Laboratorien zu ermöglichen, wäre eine Standardisierung der unterschiedlichen Verfahren zur Quantifizierung nötig. Als eine Verbesserung der oben anhand der CML vorgestellten Methode zur absoluten Quantifizierung ist ein Ansatz denkbar, der in derselben Reaktion das Referenzgen mitquantifiziert. Darüber hinaus könnten mehr als eine Zielse-

quenz in einer Reaktion detektiert werden, um weitere für die Entwicklung von Leukämien relevante Gene zu quantitativ zu erfassen.

Literatur

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Method Enzymol* 1987;155:335-50.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487.
- Feroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult lymphoblastic leukaemia by molecular analysis. *Br J Haematol* 1999;105:7-24.
- Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Reichert A, Sauße S, Hehlmann R. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results in Cancer Research* 1998;144:36-45.
- Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, Bakkus M, Thielemans K, Grandchamp B, Vilmer E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. N Engl J Med* 1998;339:591-8.
- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J and the German CML Study Group. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994;84:4064-77.
- Hochhaus A, Lin F, Reiter A, et al. Variable numbers of BCR-ABL transcripts persist in CML patients who achieve complete cytogenetic remission with interferon- α . *Br J Haematol* 1995;91:126-31.
- Epstein FH. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:164-72.
- Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. Detection of residual leukemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukemia: Role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood* 1991;77:874.
- Miyamura K, Tahara T, Tanimoto M, Morishita Y, Kawashima K, Morishima Y, Saito H, Tsuzuki S, Takeyama K, Kodera Y. Long persistent bcr-abl positive transcript detected by PCR after marrow transplant for chronic myelogenous leukemia without clinical relapse: A study of 64 patients. *Blood* 1993;81:1089.
- Lin F, van Rhee F, Goldman JM, Cross NC. Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:4473-8.
- Livak KJ, Flood J A, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357-62.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7276-80.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22:176-81.
- [16] Bohling SB, King TC, Wittwer CT, Elenitoba-Johnson KSJ. Rapid simultaneous amplification and detection of the MBR/JH chromosomal translocation by fluorescence melting curve analysis. *Am J Pathol* 1999;154:97-103.
- Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA. Light-Cycler Technology for the Quantitation of bcr/abl Fusion Transcripts. *Cancer Res* 1999;59:3171-4.
- Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM, Estrov Z. Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood* 1999;93:2755-9.
- Lion T. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia by quantitative polymerase chain reaction and clinical decision making. *Blood* 1999;94:1486-7.
- Goldman JM, Kaeda JS, Cross NCP, Hochhaus A, Hehlmann R. Clinical decision making in chronic myeloid leukemia based on polymerase chain reaction analysis of minimal residual disease. *Blood* 1999;94:1484-5.
- Kreuzer KA, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H, Pauli G, Huhn D, Schmidt CA. Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-free Detection of β -Actin Transcripts as Quantitative Reference. *Clin Chem* 1999;45:297-300.
- Richard LS, Dillon J, Stuart HR. Control genes for reverse transcription-polymerase chain-reaction: A comparison of beta actin and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Br J Haematol* 1997;97:247-8.
- Emig M, Sauße S, Wittor H, Weißer A, Reiter A, Willer A, Berger U, Hehlmann R, Cross NCP, Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 1999;13:1825-32.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA. Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ chemistry in the LightCycler™ instrument. *Mol Cell Probes*, im Druck.
- Pongers-Willemsse MJ, Verhagen OJHM, Tibbe GJM, Wijkhuijs AJM, de Haas V, Roovers E, van der Schoot CE. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia* 1998;12:2006-14.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobson D, van Rhee F, Mittermüller J, de Witte T, Holler E, Ansari H. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-50.
- Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schapp N, Geurts van Kessel A, De Witte T. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol* 1998;102:768-74.
- Eder M, Battmer K, Kafert S, Stucki A, Ganser A, Hertenstein B. Monitoring of BCR-ABL expression using real-time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia* 1999;3:1383-9.