

Jörg Wacker

Dr.med.

Etablierung eines automatisierten Sequenzierungssystems zum molekulargenetischen Monitoring bei Patienten mit multiplemyelom

geboren am 12.06.1969 in Kirn

Reifeprüfung am 11.05.1989

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis WS1998/99

Physikum am 24.03.1993

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 18.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. H. Goldschmidt

Das Multiple Myelom ist eine maligne klonale Erkrankung der lymphoproliferativen B-Zellen. Myelomzellen sind vorwiegend im Knochenmark lokalisiert, wo sie durch langsame Proliferation die normale Hämatopoese verdrängen und zu Knochendestruktion führen. Durch verbesserte Therapiemöglichkeiten wie Hochdosis-Chemotherapien mit autologer Blutstammzelltransplantation konnten die Raten an kompletten Remissionen erhöht werden. Dennoch gibt es für diese häufige hämatologische Erkrankung derzeit noch keine kurativen Therapieansätze.

Als Ursache der Rezidive wird die nicht vollständige Elimination der Tumorzellen durch die Chemotherapie und somit das Überleben von zytostatikaresistenten Myelomzellen angesehen.

Durch sensitive Nachweisverfahren wie der allelspezifischen CDR-3-PCR können auch bei Patienten, die klinisch eine komplette Remission zeigen, Zellen des malignen Tumorklons nachgewiesen werden. Ob das Erreichen einer molekularen Remission eine Voraussetzung für die Heilung des Multiplemyeloms darstellt, ist derzeit noch unklar. Die molekulargenetischen Verlaufsuntersuchungen sind dabei jedoch eine wichtige Ergänzung zur klinischen Beurteilung des Erkrankungs-Stadiums.

Um die Anzahl der identifizierbaren CDR-3-Sequenzen der malignen Tumorklone vor allem bei Patienten in frühen Erkrankungsstadien mit geringer Tumorlast zu erhöhen, wurde ein automatisches, auf Laser-Fluoreszenz basierendes Sequenziersystem eingeführt.

Die zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA wurde aus enzymatisch lysierten Bakteriensuspensionen gewonnen und ohne weitere Aufreinigungsschritte für Cycle-Sequencing-Reaktionen verwendet.

Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten fehlerfreie Sequenzen bis zu einer Sequenzlänge von 450bp erzielt werden, die deutlich über der Länge der zu sequenzierenden PCR-Produkte der CDR-3-Regionen lag. Es gelang bei 880 durchgeführten C-tracking-Reaktionen (=Ermittlung der Abfolge der Cytosin-Basen in einer DNA-Sequenz) 768 identifizierbare und miteinander vergleichbare C-Muster der CDR-3-Regionen zu erzeugen.

Bei drei von fünf untersuchten Patienten mit Multiplem Myelom mit Knochenmarkinfiltration zwischen 20% und 80% gelang die Isolierung der klonotypischen CDR-3-Sequenz. Mithilfe von ASO-Primern wurden Knochenmark- und Blutproben sowie Leukaphereseprodukte und FACS sortierte Zellfraktionen auf residuale Tumorzellen untersucht.

In den im Verlauf der Erkrankung entnommenen 33 Proben aus Knochenmark und peripherem Blut der Myelompatienten wurde in 32 Fällen (96%) der Tumorklon nachgewiesen. Alle untersuchten Leukaphereseprodukte zeigten eine Kontamination mit Tumorzellen. Die nach dem Stammzell-Oberflächenantigen CD34 sortierten Zellenfraktionen waren in den ASO-PCR Ansätzen frei von Zellen des Tumorklons.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Direktlyse und die automatische Sequenzierung mit dem ALFexpress eine schnelle und zuverlässige Methode darstellt, um allelspezifische Oligonukleotide für die ASO-PCR zu ermitteln. Voraussetzung für die erfolgreiche Isolierung des Tumorklons stellt das Vorliegen einer Bande im polyklonalen Schmier der Konsensus-PCR dar.

Durch die ASO-PCR ist eine Verlaufskontrolle der Erkrankung von Beginn an möglich. Durch quantitative PCR-Ansätze lassen sich die Tumorkontamination von Transplantaten bestimmen und die Auswirkungen von neuen Therapieformen auf die Tumorlast in KM und PB verfolgen.