

Christoph Georg Wolfgang Sucker
Dr. med.

Nachweis residualer Tumorzellen bei Patienten mit Multiplem Myelom durch allelspezifische Polymerase Kettenreaktion

Geboren am 27.02.1970 in Darmstadt.
Reifeprüfung am 18.05.1989 in Darmstadt
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis zum WS 1996/97
Physikum am 31.08.1992 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heilbronn
Staatsexamen am 28.04.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. H. Goldschmidt

Das Multiple Myelom ist eine klonale B-Zellerkrankung. Unter der Standardtherapie mit Melphalan und Prednison liegt die mediane Überlebenszeit bei etwa drei Jahren; Polychemotherapien konnten die Prognose nicht signifikant verbessern.

Die Hochdosis-Chemotherapie mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung stellt eine neue, erfolgversprechene Therapieoption dar; aufgrund der myeloablativen Wirkung der Therapie ist eine nachfolgende Transplantation hämatopoetischer Stammzellen notwendig. Mehrere Studien belegen den signifikanten Überlebensvorteil für hochdosistherapierte Patienten. Schneller hämatopoetische Rekonstitution und geringerer Gehalt maligner Zellen sind entscheidende Vorteile der peripheren Blut-Stammzell-Transplantation gegenüber der autologen Knochenmark-Transplantation.

Das Erreichen einer kompletten Remission nach konventionellen Kriterien durch die Hochdosistherapie erfordert neue molekularbiologische Methoden zum sensitiven und spezifischen Nachweis maligner Zellen. Zu diesem Zweck sollten im Rahmen dieser Arbeit allelspezifische Oligonukleotide komplementär zur „Complementarity Determining Region 3“ (CDR3-Region) der Tumorklone entworfen und zum Nachweis maligner Zellen verwendet werden.

Die CDR3-Region auf Chromosom 14 codiert für die hypervariablen Regionen der Immunglobulin-Schwerketten; diese tragen zur Antigen-Spezifität der Antikörper bei. Aufgrund komplexer Rekombinationsvorgänge im Verlauf der B-Zellentwicklung weist die CDR3-Region eine Sequenz auf, die für jeden B-Zellklon einzigartig ist. Da die Region von hochkonservierten Sequenzen flankiert wird, kann sie unter Verwendung von Konsensus-Primern durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (CDR3-PCR) und anschließend weiter analysiert werden.

Die Amplifikate der CDR3-PCR wurden kloniert. Anschließend wurden die Sequenzen anhand ihrer C-Muster verglichen. Da identische CDR3-Sequenzen unter normalen B-Lymphozyten nur mit einer Häufigkeit von 1 : 20000 vorkommen, fanden sich nur die CDR3-Regionen der malignen Klone mehr als

zweifach. Gegenüber der alleinigen CDR3-PCR zeichnet sich die C-Muster-Analyse dadurch aus, daß die Monoklonalität direkt anhand der DNA-Sequenz nachweisbar ist. Die Identifikation des Tumorklons ist daher auch bei geringem relativen Anteil unter der polyklonalen B-Zell-Population möglich.

Nach Identifizierung der CDR3-Regionen der malignen Klone in der C-Muster-Analyse wurden die entsprechenden CDR3-Regionen sequenziert. Komplementär zu den gefundenen Sequenzen wurden allelspezifische Oligonukleotide (ASO) entworfen und in der ASO-PCR als Sonden hoher Spezifität und Sensitivität eingesetzt.

Alle untersuchten DNA-Proben aus peripherem Blut und Knochenmark waren PCR-positiv. Außerdem konnten mit ASO-Primern in neun von zehn untersuchten Leukapherese-Produkten eine Kontamination mit Tumorzellen nachgewiesen werden. Alle CD34⁺-Fraktionen hämatopoetischer Progenitorzellen mit Reinheiten zwischen 96,9 - 99,1% waren bei PCR-Positivität der zugehörigen Leukapheresen PCR-negativ. Diese Ergebnisse zeigen, daß zirkulierende Myelomzellen das Stammzellantigen CD34 nicht exprimieren. Hingegen waren alle CD19⁺-Zellfraktionen PCR-positiv.

Mit der ASO-PCR ist ein Nachweis maligner Zellen mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich. Dies gewinnt besondere Bedeutung bei Patienten, die sich gemäß konventioneller Kriterien in kompletter Remission befinden. Die Überwachung minimaler Resterkrankungen (MRD) ist möglich. Mit dem Kriterium der PCR-Negativität kann eine molekularbiologische Remission definiert und zum Monitoring der Erkrankung eingesetzt werden. Die Wirksamkeit künftiger Therapieformen kann daran gemessen werden, inwieweit sie in der Lage sind, PCR-Negativität von peripherem Blut und Knochenmark herbeizuführen; hierzu ist die Hochdosistherapie mit peripherer Blut-Stammzell-Transplantation bisher nicht in der Lage.

Obwohl die Bedeutung reinfundierter Tumorzellen in Autotransplantaten für eine erneute Krankheitsprogression derzeit nicht bekannt ist, werden verschiedene Methoden zur Tumorzell-Reduktion erprobt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Gewinnung eines PCR-negativen peripheren Blut-Stammzell-Transplantates durch Anreicherung von CD34⁺-Zellen möglich („Positivpurgung“).

Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Patient mit der seltenen Koexistenz von chronisch lymphatischer Leukämie und Multiplem Myelom untersucht. Durch vergleichende Sequenzanalyse wurde ein gemeinsamer klonaler Ursprung der beiden B-Zell-Erkrankungen nachgewiesen.