

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie und Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Durchflusszytometrische Bestimmung der
Minimal Residual Disease bei pädiatrischen
Patienten mit akuten Leukämien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Timo Franz Sugg
aus
Ravensburg

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Stevanovic

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Leukämien im Kindesalter	1
1.1.1	Historisches und Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.4	Klassifikation	3
1.1.5	Klinik	3
1.1.6	Diagnostik	4
1.1.7	Therapie	4
1.1.8	Akute Leukämien im Kindesalter	5
1.2	Hämatopoetische Stammzellen	8
1.2.1	Definition	8
1.2.2	Eigenschaften und Funktionen von HSCs	9
1.2.3	Identifizierung von HSCs	11
1.3	Minimal Residual Disease	12
1.3.1	Grundlagen, Durchführung und Zielsetzung	12
1.3.2	Wissenschaftlicher Stand der MRD bei kindlichen Leukämien	16
1.4	Studienziel	24
2	PATIENTEN UND MATERIAL	26
2.1	Definition und Herkunft der Patientenproben	26
2.2	Ein-/Ausschlusskriterien der Patientenproben	26
2.3	Kontrollproben	27
2.4	Patientenproben	28
2.5	Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.6	Verwendete Chemikalien	32
2.7	Verwendete Stammlösungen	33
2.8	MRD-Reagenzien	34
2.8.1	Fluorochrom-konjugierte Antikörper	34
2.8.2	Unkonjugierte Fluorochrome (Lebend/Tot-Marker)	39
2.8.3	Beads	40
2.9	EDV-Software	40

3	METHODEN	41
3.1	Herstellung der Stammlösungen.....	41
3.1.1	Einfriermedium.....	41
3.1.2	Auftaulösung.....	41
3.1.3	PBSA	41
3.1.4	Paraformaldehydlösung (PFA)	42
3.1.5	Waschpuffer.....	42
3.2	Vorbereitung und Bearbeitung der Patientenproben	43
3.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen	43
3.2.2	Extrazelluläre Färbung der Zellen (direct staining).....	45
3.2.3	Intrazelluläre Färbung der Zellen (intracellular staining).....	46
3.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen	47
3.2.5	Lebend/Tot-Differenzierung mittels Fluorochromen	48
3.3	Messtechnik.....	49
3.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	49
3.3.2	Konfiguration und Ausstattung der Messgeräte.....	52
3.3.3	Kalibrierung und Kompensation der Messgeräte.....	54
3.3.4	Messung der Patientenproben.....	56
3.4	Datenauswertung	59
3.4.1	Auswertung der FACSCalibur Daten.....	60
3.4.2	Auswertung der Daten am LSR II	75
4	ERGEBNISSE	76
4.1	Optimierung der MRD-Analyse am FACSCalibur.....	76
4.1.1	Integration regenerativer Kontroll-Proben.....	77
4.1.2	Entwicklung neuer Auswertungsstrategien.....	81
4.1.3	MRD-Bestimmung mittels HLA-Antikörpern	87
4.1.4	Zusammenfassung des Kapitels.....	94
4.2	Transfer und Etablierung der MRD am LSR II	95
4.2.1	Ergebnisse der Lebend/Tot-Assays.....	96
4.2.2	Ergebnisse der Antikörper-Titrationen	101
4.2.3	Entwicklung von Gating- und Auswertungsstrategien am LSR II ..	106
4.2.4	Zusammenfassung des Kapitels.....	110
4.3	Einzelmessungen von B-ALLs im Vergleich	111
4.3.1	Patientin 1.....	111
4.3.2	Patient 2.....	121
4.3.3	Zusammenfassung des Kapitels.....	130
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	131

5	DISKUSSION.....	133
5.1	Diskussion der Ergebnisse	133
5.1.1	Optimierung der MRD Messung am FACSCalibur	133
5.1.2	Neuerungen am LSR II Durchflusszytometer	135
5.1.3	Transfer und Etablierung der MRD am LSR II.....	135
5.1.4	Vorteile und Nachteile gegenüber dem FACSCalibur	139
5.1.5	Diskussion der Einzelmessungen.....	141
5.1.6	MRD-Bestimmung mittels HLA-Antikörpern	144
5.2	Multicolor-Durchflusszytometrie bei MRD-Messungen.....	145
5.2.1	Wissenschaftliche Einordnung.....	145
5.2.2	Grenzen der MRD-Bestimmung per FACS.....	147
5.3	Ausblick	149
6	ZUSAMMENFASSUNG	151
7	LITERATURVERZEICHNIS	153
8	ANHANG	163
8.1	Messplanungsformulare.....	163
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	168
8.3	Tabellenverzeichnis	170
9	DANKSAGUNG.....	172
10	LEBENS LAUF	173

Abkürzungsverzeichnis

AF	AlexaFluor
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATRA	All-trans retinoic acid
CALLA	Common acute lymphocytic leucemia antigen
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
Cy	Cyanine
DC	Durchflusszytometrie
ED	Erstdiagnose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KM	Knochenmark
KMT/SZT	Knochenmark-/Stammzelltransplantation
MNC	Mononuclear cells
MPO	Myeloperoxidase
MRD	Minimal Residual Disease
MTX	Methotrexat
PB	Pacific Blue
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidium Iodid
RT	Raumtemperatur (+20°C)
(RT-)PCR	(Real time-)polymerase chain reaction
SSC	Side Scatter
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase

1 Einleitung

1.1 Leukämien im Kindesalter

1.1.1 Historisches und Definition

Im Jahre 1845 beschrieb Rudolf Virchow mit dem Begriff „Leukämie“ erstmals eine Erkrankung, deren Pathogenese auf einer erhöhten Zahl von Leukozyten beruht. Der sich aus dem Griechischen ableitende Begriff „Leukämie“ bedeutet wörtlich übersetzt „weißes Blut“, eine anschaulich zutreffende Beschreibung für die Morphologie einer leukämischen Blutprobe, die durch die anteilig stark vermehrten Leukozyten einen hohen „weißen“ Überstand über der Erythrozytenschicht zeigen kann. Heute kennt man die Proliferation unreifer hämatopoetischer Zellen als ein gemeinsames Charakteristikum aller Leukämien, die zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark führt und eine Infiltration extramedullärer Organe nach sich ziehen kann.⁹⁹ Leukämien stellen die häufigsten malignen Erkrankungen im Kindesalter dar.⁶¹

1.1.2 Epidemiologie

Mit einem Anteil von 35-40% aller kindlichen Malignome sind Leukämien die häufigsten bösartigen Erkrankungen im Kindesalter. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) macht unter den Leukämien einen Anteil von ca. 80%, die akute myeloische Leukämie (AML) einen Anteil von ca. 18% aus. Zu den selteneren Formen zählt die chronisch myeloische Leukämie (CML) mit etwa 2% aller kindlichen Leukämien. Die beim Erwachsenen bekannte chronisch lymphatische Leukämie (CLL) kommt bei Kindern praktisch nicht vor.⁹⁹

Nach den Leukämien zählen Tumoren des Zentralnervensystems und maligne Lymphome zu den häufigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter.

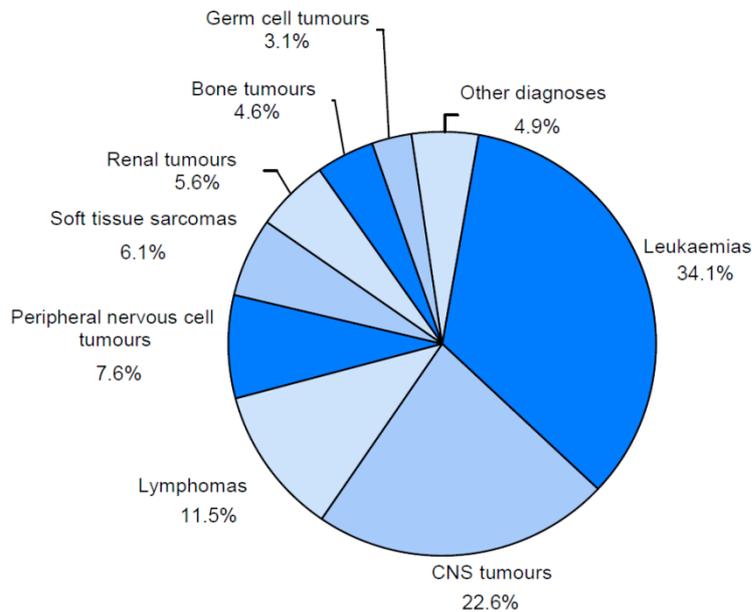


Abb. 1.1: Verteilung der Malignome im Kindes- und Jugendalter ⁶¹

Die Abbildung zeigt die Verteilung der malignen Erkrankungen im Kindesalter bis zum 15. Lebensjahr.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Leukämien ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Es lassen sich prädisponierende Faktoren beschreiben: Erkrankungen mit chromosomalen Anomalien wie beispielsweise die Fanconi-Anämie (multiple Chromosomenstörungen) oder das Down-Syndrom (Trisomie 21), aber auch Immundefekterkrankungen wie beispielsweise die schwere kombinierte Immundefizienz (SCID) oder Agammaglobulinämie gehen mit einem erhöhten Risiko eine Leukämie zu entwickeln einher. Neben diesen Faktoren spielt auch die Exposition gegenüber bestimmten Karzinogenen wie Benzol, radioaktiver Strahlung oder alkylierenden Substanzen eine Rolle für die Entstehung von Leukämien. Pathogenetisch kommt es bei Leukämien durch das unkontrollierte Wachsen unreifer hämatopoetischer Zellen, den sogenannten Blasten, zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese im Knochenmark und damit zu Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie, meist also zu einer anteiligen Verminderung aller Zellen des Blutes.⁹⁹ Hierbei spricht man von einer sogenannten Panzytopenie. Außerdem ist eine Infiltration extramedullärer Organe möglich,

so kann es beispielsweise zu einer Aussaat der Leukämie in den Liquorraum kommen, einer sogenannten Meningeosis leucaemica.

Als ein wichtiger Faktor sowohl für die Pathogenese der Entstehung von Leukämien als auch für die Aufrechterhaltung der leukämischen Zellpopulation wurde in Studien der letzten Jahre das Konzept der leukämischen Stammzelle neben hämatopoetischen Stammzellen beschrieben und näher untersucht.²

1.1.4 Klassifikation

Die Einteilung der Leukämien erfolgt anhand morphologischer, zytochemischer, immunologischer, biochemischer, zytogenetischer und molekulargenetischer Merkmale. Für die ALL und AML bestehen weitere Unterteilungen, die in Kap. 1.1.8 aufgeführt werden und mit unterschiedlichen Prognosen assoziiert sind.⁹⁹ Nachfolgende Abbildung zeigt charakteristische KM-Ausstriche bei ALL (links) und AML (rechts), man erkennt links Lymphoblasten vom Typ FAB L1/L2, rechts myeloische Blasten vom Typ FAB M2 sowie die für die AML typischen Auer-Stäbchen.

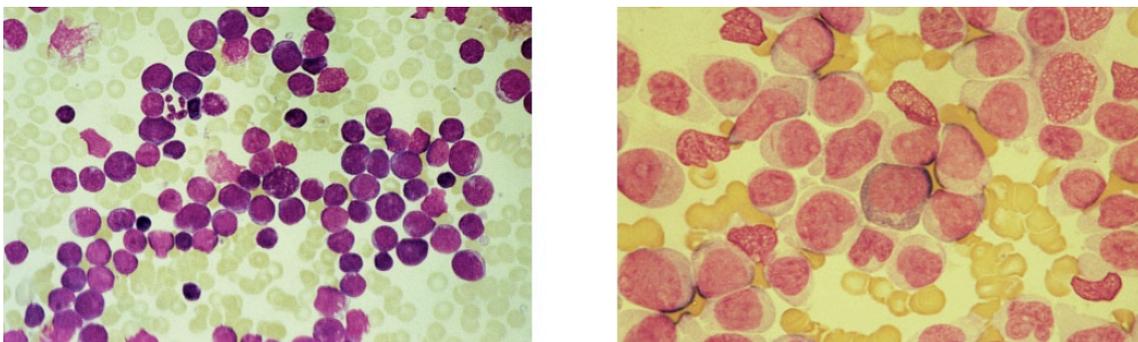


Abb. 1.2: Knochenmarksausstrich bei ALL und AML⁹⁹

Im linken Bild (ALL) Lymphoblasten vom Typ FAB L1/L2, rechts (AML) myeloische Blasten vom Typ FAB M2 und Nachweis von Auer-Stäbchen (aus: Sitzmann FC, Bartmann P. Pädiatrie. Stuttgart: Thieme, 2007).

1.1.5 Klinik

Die Symptomatik einer akuten Leukämie entwickelt sich meist innerhalb weniger Wochen. Es besteht häufig Müdigkeit und Appetitlosigkeit, oftmals auch Fieber aufgrund einer durch die Granulozytopenie bedingten Infektion. Die durch die begleitende Thrombozytopenie verursachte Blutungsneigung zeigt

sich in Form von Nasenbluten, Hirn- und Schleimhautblutungen, daneben finden sich häufig Knochenschmerzen und in 2/3 der Fälle fällt eine generalisierte Lymphknotenschwellung und Hepatosplenomegalie auf. Bei Infiltration des ZNS kommt es außerdem zu Krampfanfällen, Sehstörungen und Hirndruckzeichen.⁹⁹

1.1.6 Diagnostik

Aufgrund der Symptomatik kann oftmals bereits klinisch eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Zur Diagnostik dienen Differenzialblutbild, Knochenmarksausstrich und Liquorzytologie. Eine abdominale Sonographie erfasst zudem Hepatosplenomegalie, intraabdominelle Lymphome und eine mögliche Niereninfiltration.⁹⁹

1.1.7 Therapie

Behandlungsziel bei akuten Leukämien ist die Vernichtung der annähernd gesamten Leukämiezellpopulation und damit die Heilung. Die Therapie erfolgt dazu in mehreren Phasen: Der Induktions-, Konsolidierungs-, Reintensivierungs- und Erhaltungstherapie. Ziel der Induktionstherapie ist zunächst eine vollständige Remission, das bedeutet eine Elimination der Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark sowie der Organinfiltrationen. Die nachfolgenden Phasen dienen dem Erhalt dieser Remission und somit dem krankheitsfreien Überleben. Um Nebenwirkungen und Komplikationen der aggressiven Chemotherapie vorzubeugen ist außerdem eine Supportivtherapie notwendig, dazu zählen u.a. auch Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten und Frischplasma, um etwaige Blutungen kontrollieren zu können. Unbehandelt liegt die Letalität der Leukämien bei 100%.⁹⁹ Neben der eigentlichen Therapie, die fast ausschließlich in kideronkologischen Zentren und im Rahmen sogenannter Therapieoptimierungsstudien erfolgt, ist auch eine Überwachung der Therapie zur Kontrolle von Therapieansprechen bzw. Resistenzbildung, zur Bewertung des klinischen Verlaufs und zur Erhebung prognostischer Faktoren notwendig. Diese Überwachung findet u.a. in der Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) Anwendung. Bei der Messung dieser sogenannten MRD wird der prozentuale An-

teil der trotz Chemotherapie verbliebenen malignen Blasten im Knochenmark meist durchflusszytometrisch bestimmt und im zeitlichen Verlauf beurteilt. Die Relevanz dieser Messungen zeigt sich u.a. in der Bewertung als prognostische Faktoren: Nicht immer gelingt es, unter Therapie ein MRD-negatives Ergebnis bei den Patienten zu erreichen. In anderen Fällen werden Patienten, die am Ende der Behandlung MRD-positiv waren, ohne weitere Therapie MRD-negativ, sodass eine Rolle des Immunsystems bei der Beseitigung leukämischer Blasten zu diskutieren ist.³⁹ In Kapitel 1.3 soll auf das Konzept der minimalen Resterkrankung näher eingegangen werden.

1.1.8 Akute Leukämien im Kindesalter

1.1.8.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL ist mit 25% aller Krebserkrankungen die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter. Die Inzidenz der ALL wird mit 3,5/100.000 Kindern/Jahr unter 15 Jahren angegeben. Mit einem Verhältnis von 1,2 : 1 sind Jungen etwas häufiger betroffen als Mädchen, der Altersgipfel liegt zwischen 3 und 5 Jahren.⁹⁹

Je nach Antigenmuster unterscheidet man immunologisch folgende Hauptformen und Subtypen der ALL:

ALL Hauptform	Anteil an allen ALLs	Subtypen
B-Vorläufer-Zell-ALL	84%	prä-prä-B-ALL common ALL (c-ALL) prä-B-ALL
Reifzellige B-ALL	3%	
T-ALL	13%	frühe T-ALL kortikale T-ALL reife T-ALL
AUL (unklassifizierbar)		
ALL mit Koexpression myeloischer Marker		

Tab. 1.1: Formen der akuten lymphatischen Leukämie

Zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen erlauben eine weitere Einteilung in prognostisch ungünstigere Formen, hierzu zählen beispielsweise die t(9,22)-positive ALL (Philadelphia Chromosom) oder die typischerweise bei Säuglingen gefundene t(4,11)-positive ALL. Hinsichtlich des Rezidivrisikos ist daher eine Stratifikation in Risikogruppen unabdingbar, mit denen unterschiedliche Therapieintensitäten und Prognosen verbunden sind.⁹⁹

Die Therapie der ALL richtet sich nach der Risikogruppe und sollte immer im Rahmen sogenannter Therapieoptimierungsstudien erfolgen. In der Universitätskinderklinik Tübingen ist das Behandlungsprotokoll ALL-BFM 2000 etabliert. Wichtigster Bestandteil der Therapie ist eine Polychemotherapie mit einer Kombination von u.a. Methotrexat (MTX), Vincristin, Anthrazyklinen, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin nach initialer Kortisongabe. Neben der systemischen Chemotherapie ist auch eine zusätzliche Behandlung des ZNS mit intrathekalen Gaben von MTX zur Vermeidung von ZNS-Rezidiven notwendig.^{67,99} Gutes Ansprechen auf Kortison zu Beginn der Induktionstherapie, d.h. < 1.000 Blasten/ μ l in peripherem Blut nach acht Tagen alleiniger Kortisontherapie, ist ein wesentlicher Faktor zur Risikostratifizierung. Als wichtigster Risiko- und Stratifizierungsfaktor ist allerdings die Bestimmung der minimalen Resterkrankung zu nennen (siehe Kap. 1.3).

Eine allogene Knochenmarktransplantation (KMT) gilt in zweiter Remission nach einem frühen Rezidiv, d.h. während oder bis zu 6 Monate nach Chemotherapie, als kurative Chance. In erster Remission ist sie lediglich bei Hochrisikopatienten indiziert.⁶⁷ Die Prognose bei ALL ist insgesamt gesehen gut. Komplette Remissionen können in etwa 95% der Fälle erreicht werden, die Überlebensrate nach 5 Jahren liegt heute bei über 80 %. Bei bestimmten Translokationen, schlechtem Ansprechen auf Kortison oder einer reifen B-ALL ist die Prognose trotz intensivierter Therapie schlechter.⁹⁹

1.1.8.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die AML ist die zweithäufigste Leukämie im Kindesalter und geht von unreifen myeloischen Zellen aus. Die Inzidenz liegt bei etwa 0,6/100.000 Kindern/Jahr unter 15 Jahren. Auch bei der AML sind Jungen etwas häufiger betroffen als

Mädchen; das Verhältnis liegt bei 1,1 : 1. Im Gegensatz zur ALL liegt der Altersgipfel bei der AML im Säuglingsalter und bei Kindern bis 2 Jahren. Die AML wird nach der FAB-Klassifikation in acht Untergruppen (M0 bis M7) eingeteilt, denen sich zum Teil charakteristische zytogenetische Befunde zuordnen lassen. Entscheidend für die Diagnose der AML sind der Nachweis der Myeloperoxidase in den Blasten und die weitergehenden immunologischen Untersuchungen.^{49,72}

AML Subtyp (FAB)	Anteil an allen AMLs	Mögliche zytogenetische Aberrationen
M0: AML mit minimaler Differenzierung	5%	
M1: AML ohne Ausreifung	15%	
M2: AML mit Ausreifung	25%	t(8;21)
M3: Akute Promyelozytenleukämie	10%	t(15;17)
M4: Akute myelomonozytäre Leukämie	20%	
M5: Akute monozytäre Leukämie	10%	
M6: Akute Erythroleukämie	5%	
M7: Akute megakaryozytäre Leukämie	5%	

Tab. 1.2: Formen der akuten myeloischen Leukämie

Das Rezidivrisiko lässt sich anhand des AML-Subtyps, der Leukämiezellmasse bei Diagnose, des ZNS-Befalls, morphologischer und zytogenetischer Befunde sowie dem Ansprechen auf Therapie einschätzen.⁹⁹ Vor allem bei der AML M5 (akute Monoblastenleukämie) ist das Risiko eines Fröhntodes, d.h. kurz vor oder nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, durch Blutungen oder Leukostase infolge der Hyperleukozytose deutlich erhöht. Die Therapie der AML besteht ähnlich wie die ALL-Therapie in einer Polychemotherapie und ggf. Knochenmarktransplantation in der ersten Remission bei Hochrisikopatienten.^{67,99} Ein-

gesetzt zur Induktions-, Konsolidierungs- und Reintensivierungstherapie werden u.a. Cytrabin, Anthrazykline, Etoposid, Thioguanin, Cyclophosphamid und Prednison. Bei der akuten Promyelozytenleukämie (FAB M3) werden durch den Einsatz von Retinoiden (ATRA) und in ausgewählten Fällen Arsentrioxid³⁹ prognostische Verbesserungen erzielt. Viskosität und Hämostase des Blutes müssen stets überwacht werden, gegebenenfalls sind Thrombozytenkonzentrate und Frischplasma zur Verbesserung der Rheologie des Blutes notwendig. Prognostisch nimmt die AML im Vergleich zur ALL einen schlechteren Verlauf. Bei etwa 20-30% der Patienten wird keine vollständige Remission erreicht, von diesen sind 50% Nonresponder auf die zytostatische Therapie und 50% versterben an frühen Komplikationen der AML (Blutung, Leukostase). Insgesamt wird die Überlebensrate nach 5 Jahren mit 47% angegeben, Kinder mit Morbus Down erreichen trotz reduzierter Therapie (erhöhte Toxizität der Zytostatika) eine Heilungsrate von 80 %. Bei der bereits erwähnten Promyelozytenleukämie hat sich die Heilungsrate durch Gabe von Retinoiden auf über 80 % verbessert.⁹⁹

1.2 Hämatopoetische Stammzellen

1.2.1 Definition

Unter hämatopoetischen Stammzellen (HSC) versteht man pluripotente Zellen, die auf der Ebene der einzelnen Zelle durch asymmetrische Teilung in alle Zellen des hämatopoetischen Systems ausdifferenzieren können und gleichzeitig die Fähigkeit haben sich durch symmetrische Teilung selbst zu erneuern. Selbsterneuerung bedeutet dabei die Entstehung zweier pluripotenter Tochter-HSCs aus einer pluripotenten HSC. Bei asymmetrischer Teilung entsteht neben einer identischen HSC eine Progenitorzelle mit reduziertem Selbsterneuerungspotential, aber der Fähigkeit zur klonalen Expansion und damit Aufrechterhaltung der zirkulierenden Blutpopulation.⁹⁰ Hämatopoetische Stammzellen repräsentieren beim Menschen bis zu 0,05 % der Zellen des Knochenmarks und sind unter anderem für die Regeneration der Zellen des hämatopoetischen Systems nach Zytostatikatherapie oder KMT verantwortlich.⁷⁸

1.2.2 Eigenschaften und Funktionen von HSCs

Bereits 1963 wurde über eine im Knochenmark lokalisierte Population sogenannter radioprotektiver Zellen berichtet, die sowohl über die Eigenschaft der Selbsterneuerung als auch über die der Differenzierung in mehrere Zelllinien verfügten.⁹⁸ Diese Thesen und die Bezeichnung dieser Zellen als radioprotektiv bauten auf Experimenten auf, die gezeigt hatten, dass Mäuse, die mit einer letalen Dosis bestrahlt worden waren, überlebten und es zu einer Repopulation hämatopoetischen Gewebes mit lymphohämatopoetischen Zellen kam, wenn man ihre Milz mit einem Bleischild schützte oder nach der Bestrahlung syngenes Knochenmark transfundierte.^{44,57,73,82} Mithilfe von modernen Methoden wie FACS konnten diese Zellen aufgereinigt und näher erforscht werden. Der Nachweis des erwähnten self-renewal lässt sich am besten durch Transplantation dieser Zellen in einen Empfänger und Messung der Aktivität der Progenitorzellen im Empfänger erbringen.⁷⁸ HSCs befinden sich darüber hinaus im Stadium der Quieszenz, d.h. einer Art Ruhezustand, in welchem keine Zellteilung stattfindet. Der Zustand der Quieszenz stellt einen natürlichen Schutz von HSCs gegenüber schädigenden Einflüssen wie z.B. in den Zellzyklus eingreifende Zytostatika dar.²¹ Experimentell lässt sich die Proliferationsfähigkeit als Kologenizität messen, d.h. sie bilden sogenannte colony forming units (CFUs) aus, was die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Zellen des hämatopoetischen Systems ermöglicht.⁹⁰ HSCs lassen sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Wiederherstellung des hämatopoetischen Systems in pluripotente Langzeit-HSCs (long-term HSCs) und pluripotente transiente (short-term) HSCs einteilen. Transiente HSCs ermöglichen im Vergleich zu Langzeit-HSCs das schnellere Wiederheranwachsen des hämatopoetischen Systems, aufgrund ihrer geringeren Selbsterneuerungsfähigkeiten jedoch nur über wenige Wochen hinweg und bis zu einem reduzierten Ausmaß, darüberhinaus sind sie schwieriger zu identifizieren. Langzeit-HSCs dagegen sind durch ihr verbessertes „self-renewal“-Potential befähigt das hämatopoetische System lebenslang aufrechtzuerhalten.⁹¹ In vivo getestet variieren beide Klassen hinsichtlich ihrer Selbsterneuerung und ihres proliferativen Potentials stark.⁷⁸ Langzeit-HSCs befinden sich vergleichsweise häufig in der Phase der Quieszenz und sind daher nur

wenig mitotisch aktiv.¹¹⁶ Es konnte gezeigt werden, dass sich lediglich 4% der Langzeit-HSCs, jedoch bis zu 18% der transienten HSCs in Phase S/G₂/M des Zellzyklus befinden.⁷⁹

Der Prozess der Ausdifferenzierung dieser Zellen wird durch vielfältige Einflussfaktoren wie Zytokine, Interaktionen mit Stromazellen und extrazelluläre Matrixproteine gesteuert.⁷⁷ Während dieses Prozesses entstehen aus den pluripotenten HSCs oligopotente Progenitorzellen als gemeinsame Vorläuferzellen für die unterschiedlichen reifen Zellen, wobei die jeweilige Zelllinie in den Progenitorzellen bereits determiniert ist. Ausdifferenzierte Blutzellen sind mit Ausnahme von Lymphozyten nicht mehr in der Lage sich zu teilen.

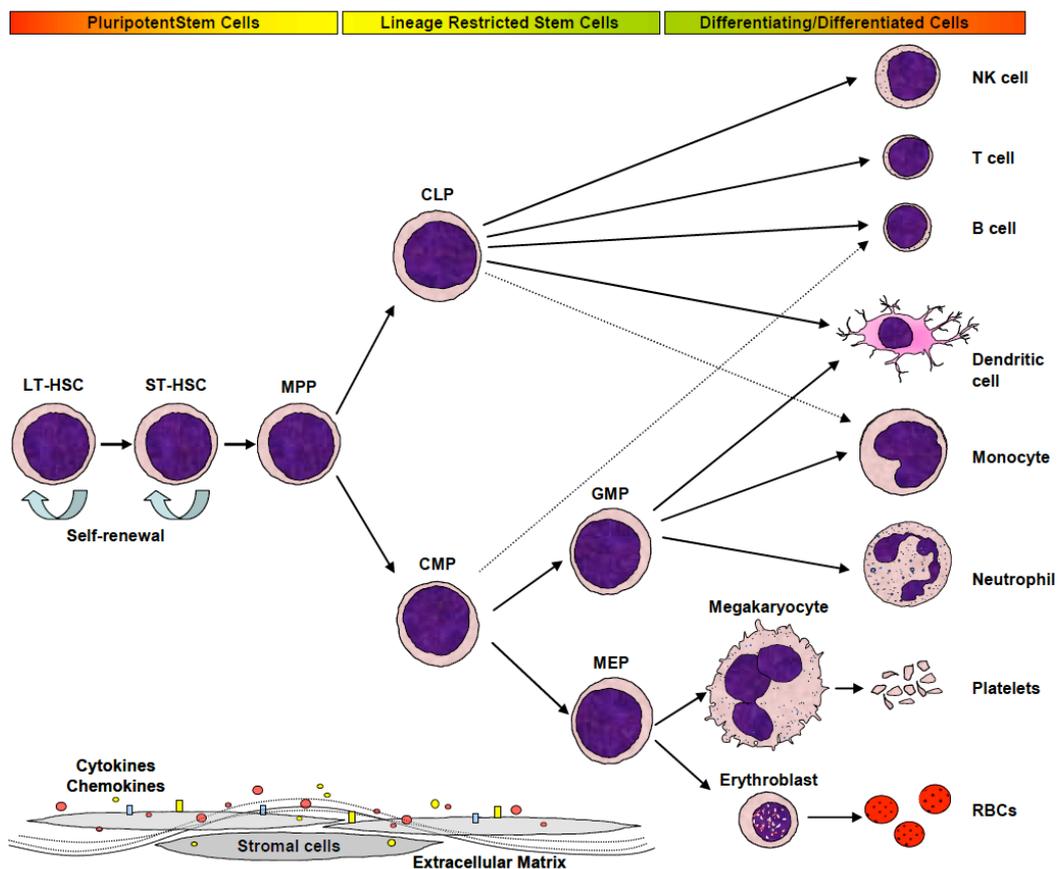


Abb. 1.3: Ontogenese hämatopoetischer Zellen aus HSCs³

Die Abbildung zeigt die sukzessive Ausdifferenzierung von Zellen des peripheren Blutes aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs). Dargestellt sind Langzeit-HSCs (LT-HSC) und transiente oder Kurzzeit-HSCs (ST-HSC) sowie multipotente Progenitorzellen (MPP), aus denen zunächst gemeinsame Vorläuferzellen der lymphatischen und myeloischen Zelllinie hervorgehen (CLP: common lymphatic progenitor, CMP: common myeloid progenitor), die sich später zu reifen Zellen des peripheren Blutes weiterentwickeln. Beeinflussende intrinsische und extrinsische Faktoren sind am unteren Bildrand abgebildet. Aus: Ahmed F. Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis. Dissertation: LMU München, 2007.

1.2.3 Identifizierung von HSCs

Die Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen erfordert eine möglichst genaue Identifizierung dieser Zellen in einer Blut- oder Knochenmarkprobe. Anhand der vielfältigen Expression von Oberflächenmarkern, die systematisch als „Cluster of Differentiation“-Antigene (CD-Antigene) eingeteilt sind, lassen sich unterschiedliche Entwicklungsstadien beschreiben, die per FACS-Analyse voneinander differenzierbar sind.² Gut etabliert ist der Nachweis von HSCs mithilfe von CD34, einem sogenannten Stammzellmarker, für den gezeigt werden konnte, dass CD34⁺-Zellpopulationen mit CFUs (colony forming units) angereichert sind. Signifikant deutlichere Stammzeleigenschaften wurden für diese CD34⁺-Zellen nachgewiesen, wenn sie gleichzeitig negativ für CD38 waren: Zellpopulationen mit dem Phänotyp CD34⁺/CD38⁻ besaßen einen vierfach erhöhten Anteil an CFUs gegenüber CD34⁺/CD38⁺-Zellen.³¹ Zur genaueren Identifikation werden zusätzliche Marker wie CD133 und CD119 eingesetzt, die hauptsächlich von erst gering differenzierten Zellen, bzw. bereits weitgehend determinierten Zellen exprimiert werden, oder weitere Marker einer sogenannten Lineage-Gruppe, d.h. Marker einer Gruppe von Zellen, die in ihrer Zelllinie bereits determiniert sind. Stammzellen lassen sich zusammenfassend also als CD34⁺/CD38⁻/lin⁻ (lin für lineage) beschreiben.⁵⁰ Die Selektion von CD34⁺-Zellen ist für den klinischen Alltag der Stammzellgewinnung für Transplantationen zum Standard geworden, obwohl gezeigt werden konnte, dass nicht alle HSCs CD34 exprimieren und auch manche CD34⁻-Zellen ein hohes Potential zur Koloniebildung haben.⁵⁰ Davon unabhängig weisen die CD34⁺-HSCs jedoch ausreichend Potential auf eine langfristige Hämatopoese nach Chemotherapie zu gewährleisten.^{7,83} Bisher konnte jedoch kein verlässlicher Oberflächenmarker identifiziert werden, um HSCs spezifisch nachzuweisen. Derzeitige Entwicklungen basieren daher hauptsächlich auf der Messung spezifischer enzymatischer Eigenschaften von Stammzellen, die wichtigsten davon sind Untersuchungen mit Hoechst 33342, einem DNA anfärbenden fluoreszierenden Farbstoff, und Messungen der Aldehyd-Dehydrogenaseaktivität (ALDH) mit einem Reagenz namens Aldefluor®, einem Substrat der ALDH.² Der Nachweis hämatopoeti-

scher und auch sogenannter leukämischer Stammzellen mit den beschriebenen Methoden ist auch Gegenstand aktueller Forschung in unserer Arbeitsgruppe.

1.3 Minimal Residual Disease

1.3.1 Grundlagen, Durchführung und Zielsetzung

Für Patienten mit akuten Leukämien konnte nachgewiesen werden, dass bei Diagnosestellung rund 10^{12} maligne Zellen verteilt im Knochenmark und peripheren Blut vorhanden sein können. Von einer morphologischen Remission der Erkrankung spricht man, wenn diese neoplastischen Zellen, d.h. Blasten, nur noch einen Anteil von maximal 5% der Zellen des Knochenmarks ausmachen, was der unteren Nachweisgrenze für einen morphologischen Nachweis der Erkrankung im mikroskopisch untersuchten Knochenmarkausstrich entspricht. Dessen ungeachtet können in dieser Situation jedoch noch immer bis zu 10^{10} neoplastische Zellen vorhanden sein, die mit morphologischen Methoden allein nicht detektierbar sind.²⁶

Im Rahmen von Untersuchungen der minimalen Resterkrankung (MRD) werden diese Zellen, welche für die Erhaltung der Leukämie und die Entstehung von Rezidiven verantwortlich gemacht werden, näher charakterisiert und beschrieben. Ihre Identifizierung und Quantität werden bei klinischen MRD-Messungen ausführlich untersucht. Zu der primären Zielsetzung der Bestimmung dieser minimalen Resterkrankung in der Klinik zählen das frühe Erkennen eines drohenden Rezidivs einer Leukämie und die Erkennung von Patienten, die aufgrund ihrer MRD-Last ein höheres Risiko für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf tragen. Zusätzlich kann durch MRD-Messungen Fragestellungen nach der Biologie einer Leukämie oder ihrem Ansprechen auf eine bestimmte Behandlung, also z.B. der Effektivität unterschiedlicher Chemotherapeutika, nachgegangen werden. Darüber hinaus können durch Messungen der minimalen Resterkrankung ZNS-Befall durch leukämische Zellen und die Effektivität der Aufbereitung von Zellen für autologe Knochenmarktransplantationen untersucht werden.^{19,26,55} Die folgende Tabelle veranschaulicht eine Auswahl möglicher Anwendungen von MRD-Messungen im klinischen Alltag.²⁶

Zeitpunkt	Anwendung
Während Induktionstherapie	Primäres Ansprechen auf Therapie
Beginn der Konsolidierungstherapie	Identifikation von Patienten mit erhöhtem Rückfallrisiko
Durchgehend während Behandlung	Erkennung eines drohenden Rezidivs
	Extramedulläre Identifizierung leukämischer Zellen (z.B. im ZNS durch Liquoranalyse)
Vor autologer SZT	Erkennung von Kontamination durch leukämische Zellen
	Evaluation von Aufbereitungstechniken
Vor allogener SZT	Identifikation von Patienten mit erhöhtem Rückfallrisiko

Tab. 1.3: Auswahl möglicher Anwendungen von MRD-Messungen

Erste Arbeiten zur Bestimmung der MRD wurden zunächst per Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.^{18,112} Es zeigte sich jedoch schnell, dass diese Methode zwar zuverlässig, eine Anzahl mehrerer Tausend Zellen manuell zu prüfen jedoch mühsam und zeitaufwändig ist. Diesen Prozess zu automatisieren und per Computer auswerten zu können, war der Grund für die Entwicklung und den raschen Zugewinn an Bedeutung für die MRD-Messung per Durchflusszytometrie. Dadurch werden neben der simultanen Analyse multipler Parameter gleichzeitig auch die Quantifizierung von Antigenen und das rasche Messen von sehr hohen Zellzahlen ermöglicht.²⁶

Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung beruht hauptsächlich auf dem Nachweis von Kombinationen an Oberflächenantigenen auf Leukozyten, die in dieser Konstellation normalerweise nicht im Blut oder Knochenmark beobachtet werden.²⁸ Man spricht dabei von einem sogenannten aberranten Immunphänotyp. Diese leukämieassoziierten Phänotypen lassen sich in durchflusszytometrischen Analysen mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörper in üblicherweise bis zu vier Farben identifizieren.²⁶ Ergänzend zu dieser Messung besteht die Möglichkeit, Zellen nach ihrer Analyse per FACS zu sortieren, d.h. nach bestimmten Eigenschaften mechanisch voneinander zu trennen und zusätzlich durch nachgeschaltete FISH- (fluorescence in situ hybridization)⁴¹ oder DNA-

Analyse⁸¹ näher zu untersuchen. Dabei können die Unterschiede in der Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche quantitativ, qualitativ oder beides zugleich sein. So ist beispielsweise die kombinierte Expression von CD3 und TdT ein typisches Merkmal von Blasten einer T-ALL, da diese Kombination auf normalen Zellen des Knochenmarks nicht beobachtet wird.²⁹ Quantitative Unterschiede liegen im Gegensatz dazu z.B. für die Marker CD38, CD45 oder CD22 vor, was bedeutet, dass leukämische Blasten in diesem Fall durch abweichende Intensität der Expression (stärker oder schwächer) des jeweiligen Markers erkannt werden. Für CD38 und CD45 stellt in diesem Sinne eine Unterexpression auf Leukozyten ein abnormales Merkmal in einigen B-ALL Fällen dar.⁹ Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung erfordert aus diesen Gegebenheiten detaillierte Informationen über die immunophänotypischen Befunde der leukämischen Zellen eines Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Nur so kann ein aussagekräftiges Follow-Up für bestimmte individuell variierende Marker gewährleistet werden. Sind diese Immunphänotypen nicht bekannt, so müsste man streng genommen die gesamte Palette potentiell nützlicher Marker untersuchen - eine kostspielige und aufwändige Option, die dazu nicht einmal garantieren kann, die minimale Resterkrankung zu identifizieren.²⁶

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der MRD-Bestimmung durch immunophänotypische Marker ist das Einschließen sogenannter Templates bei jeder Auswertung. Templates sind Knochenmarkproben von nicht maligne erkrankten Spendern wie z.B. Patienten mit einer rheumatologischen Erkrankung, sie enthalten Zellen von normalem oder regenerativem Knochenmark und dienen als Kontrolle dafür, wo die Zellpopulationen in den verschiedenen Gates für die einzelnen Marker im Falle normal regenerierenden Knochenmarks zur Darstellung kommen. Der Anteil der Fälle, die mit den beschriebenen Methoden der MRD-Bestimmung untersucht werden können, variiert aufgrund der Anzahl verfügbarer Templates und der Zahl der pro Patient untersuchten Marker.²⁶ Mit der Verfügbarkeit von Techniken zur Permeabilisierung und Fixierung von Zellen wurde es möglich, auch intrazelluläre Antigene von Zellen per Durchflusszytometrie zu detektieren.^{53,56,64,87,95,100} Diese intrazellulären Marker erweitern die Möglichkeiten, die minimale Resterkrankung in einem Patienten im Verlauf der

Erkrankung zu verfolgen. Für die Bestimmung der MRD-Last im Verlauf ist jedoch wie oben erwähnt die Definition mehrerer individueller Marker bei Diagnosestellung, mit denen sich im Einzelfall die leukämische Zellpopulation nachweisen lässt, eine grundsätzliche Voraussetzung, da so die leukämietyptischen Zellen, die unter Therapie nur noch in sehr geringer Zahl vorhanden sind, sicher nachweisbar sind. Um die Anzahl der für eine MRD-Patientenprobe zu färbenden Teströhrchen gering zu halten, sind heute Färbungen und FACS-Analysen mit vier Farben gleichzeitig etabliert.²⁶ Die Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse von Zellsuspensionen wird in Studien mit einer Detektierbarkeit von maximal 1 Zelle unter 10^6 Zellen, d.h. 10^{-6} , angegeben. Dieser Wert ist jedoch nur zu erreichen, wenn sehr viele ($\geq 10^7$ Zellen) untersucht werden und die Fluidik der Messgeräte gründlichst gereinigt wird. Da die Zellzahl in MRD-Proben wie bereits erwähnt in vielen Fällen relativ gering ausfällt (oftmals $< 10 \times 10^6$ Zellen, eigene Daten) und der aberrante leukämiespezifische Immunphänotyp nicht in jedem Fall eine so hohe Auflösung wie unter Zellsuspensionsbedingungen erlaubt, ist eine Sensitivität von 10^{-4} eine realistischere Angabe für die praktische Anwendung der MRD-Messung (siehe Kap. 5).²⁶ Für die neben der Durchflusszytometrie etablierten Methoden der MRD-Messung mittels PCR oder RT-PCR ergaben sich hinsichtlich Sensitivität recht ähnliche Ergebnisse.⁶³ Eine enge Korrelation der MRD-Last bei Leukämien mit dem klinischen Verlauf und der Prognose der Patienten konnte in mehreren Studien gezeigt werden.⁴

Vor diesem Hintergrund erklärt sich die feste Integration von Knochenmarkpunktionen und nachgeschalteter MRD-Messungen zu bestimmten Zeitpunkten in heute etablierten Behandlungsprotokollen akuter und chronischer Leukämien. Auf diese Weise kann z.B. der Nachweis einer hohen MRD-Last Patienten identifizieren, die einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind und ggf. eine intensiviertere Therapie zur Erhaltung der klinischen Remission benötigen.

1.3.2 Wissenschaftlicher Stand der MRD bei kindlichen Leukämien

1.3.2.1 Allgemeines

Messungen der minimalen Resterkrankung (MRD) bei Kindern mit akuten Leukämien liefern wichtige Informationen für das Therapieansprechen und sind ausschlaggebende Parameter für die Stratifizierung der Therapieintensität aktueller Behandlungsprotokolle.

Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) basieren die MRD-Messungen entweder auf der Amplifikation von Antigen-Rezeptor-Genen durch PCR, oder auf dem Nachweis eines abnormalen Immunphänotyps mittels Durchflusszytometrie (DC). Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) steht derzeit für die Mehrheit der Fälle nur die FACS-gestützte Messung der MRD zur Verfügung; nur in wenigen Fällen, wenn chromosomale Veränderungen oder Fusionstranskripte vorliegen, ist eine Verfolgung der MRD einer AML auch mittels PCR möglich.²³ Wie unten diskutiert, konnte in mehreren großen klinischen Studien eine deutliche Korrelation zwischen MRD-Last und Rezidivrisiko gezeigt werden.^{32,35,36} Die Anpassung der Therapieintensität hin zu aggressiveren oder weniger aggressiven Chemotherapiekonzepten und die Einteilung von Patienten in Standard-, Mittel- oder Hochrisikogruppen in Abhängigkeit von der individuellen MRD-Last können somit als direkte klinische Anwendungen der MRD angesehen werden. Darüberhinaus helfen die Ergebnisse der MRD-Forschung beim Verständnis zellulärer und molekularer Mechanismen der Entstehung von Therapieresistenzen *in vivo*.²³ Nach Abschluss der Induktionstherapie sind beim größten Teil der Patienten leukämische Zellen unterhalb der mit morphologischen Methoden detektierbaren Grenze vorhanden. In dieser Situation ist es unter alleinigem Einsatz morphologischer Methoden denkbar einen nicht unwesentlichen Anteil leukämischer Zellen (den sogenannten „leukemic burden“) mit der Folge einer Untertherapie und erhöhtem Rezidivrisiko zu übersehen. Dem gegenüber steht jedoch die Überschätzung des Anteils leukämischer Zellen mit nachfolgender Übertherapie und erhöhter Toxizität, da sich normale hämatopoetische Zellen und leukämische Blasten morphologisch sehr ähnlich sind und die Zuordnung subjektiv erfolgt.²⁸

Diese Umstände haben in den vergangenen zwei bis drei Jahrzehnten zur Erforschung von Methoden geführt, mit denen das Ausmaß der leukämischen Zellen in Patienten mit morphologischer Remission genauer, d.h. wesentlich sensibler, und vor allem objektiv erfasst werden kann. Das Resultat dieser Entwicklungen bedeutet bisher eine um den Faktor 100 oder mehr erhöhte Sensitivität der MRD-Messungen mit den genannten Methoden DC und PCR im Vergleich zu rein morphologischen Messungen.^{24,102} Die Definition einer klinischen Remission und angepasste Behandlungskonzepte werden auf diese Weise durch fortlaufende Messungen der minimalen Resterkrankung im Verlauf der Erkrankung entscheidend mitbestimmt.

1.3.2.2 Methodik – Durchflusszytometrie vs. PCR

Das gemeinsame Prinzip beider etablierter Nachweismethoden der minimalen Resterkrankung – Durchflusszytometrie und (Real-Time-)PCR – basiert auf dem Nachweis molekularer und/oder zellulärer Veränderungen, die es ermöglichen, leukämische Blasten von normalen Zellen der Hämatopoese zu differenzieren.^{24,102} Dazu gilt es bei beiden Methoden zunächst geeignete Merkmale zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oder eines Rezidivs zu identifizieren, um sie im Verlauf für die Bestimmung der minimalen Resterkrankung einsetzen zu können. Die sich daraus ergebende Anwendbarkeit einer Methode für die Verfolgung der MRD eines Patienten ist abhängig von Existenz und Anzahl besagter Unterschiede, die wie oben erwähnt bei der DC auf der Expression abnormaler Immunphänotypen und bei der PCR entweder auf Gen-Rearrangements von Immunglobulin- (Ig) oder T-Zellrezeptor- (TCR) Proteinen oder der Amplifikation von Fusionstranskripten beruhen. Campana und Coustan-Smith geben für die Anwendbarkeit der DC auf ALL-Patienten einen Anteil von 98 % der untersuchten Fälle an, für die AML 93 %.^{23,24,26,35} Ein PCR-Nachweis Ig- und TCR-codierender Gene lässt sich, wie Pongers-Willemse et al. zeigen, in 90 % der Fälle für die ALL⁸⁸ und nach Boeckx et al. nur in < 10 % der Fälle für die AML erbringen.¹² Der Nachweis von Fusionstranskripten durch RT-PCR gelingt nach Van der Velden et al. nur in < 50 % der ALL-Fälle und < 20 % der AML-Fälle.¹¹⁰

Das Monitoring der Persistenz klonaler Antigen-Rezeptor-Gene durch PCR erlaubt eine sehr sensitive und dabei objektive Erfassung der MRD (s. unten). Trotzdem kann die Reliabilität der PCR-Methode in manchen Fällen verringert sein: Liegen in einer Population leukämischer Zellen mehrere Gen-Rearrangements vor, so kann ein bei Diagnosestellung unbedeutender Klon im Verlauf der Erkrankung dominant werden und dem Monitoring entgehen, wenn nur der initial dominante Klon verfolgt wird.^{103,108} Daher ist es ratsam, sofern vorhanden, zwei oder mehr unterschiedliche Gen-Rearrangements zu verfolgen. In einer großen Studie von Flohr et al. an insgesamt 3341 Patienten konnten für 71 % (2365) zwei oder mehr dieser sogenannten Targets identifiziert werden, in 20 % (671) der Fälle jedoch nur ein einzelnes Target.⁴³ Ausführliche Studien für die standardisierte klinische Anwendung des PCR-gestützten Nachweises wurden von der BIOMED Collaborative Group erstellt und 2007 publiziert.¹⁰⁹ Bei der MRD-Analyse durch real-time-PCR ist das PCR-Produkt direkt proportional zur Anzahl leukämischer Zellen, da jede Zelle eine Kopie des Gen-Rearrangements trägt. Für die Sensitivität der (RT-)PCR werden in der praktischen MRD-Analyse Werte von etwa 10^{-3} bis 10^{-5} angegeben, was einer Detektion von einer leukämischen Zelle unter 1.000 bis 100.000 Zellen entspricht.²³ Die Untersuchung von Targets, die durch chromosomale Veränderungen und resultierende Gen-Fusionen bedingt sind, bietet eine dritte Möglichkeit für die MRD-Analyse mittels (RT-)PCR. Dazu zählen Fusionstranskripte wie beispielsweise BCR-ABL1, MLL-AFF1, TCF3-PBX1 und ETV6-RUNX1 bei der ALL oder RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11 und PML-RARA bei der AML. Nach van Dongen et al. und Gabert et al. besteht der größte Nachteil bei der Verfolgung der MRD anhand von Fusionstranskripten neben der relativen Seltenheit von Fällen mit positivem Nachweis eines Targets allerdings darin, dass die Anzahl von Transkripten pro (leukämischer) Zelle unter den Patienten mit identischem genetischem Leukämie-Subtyp stark variiert und zudem durch Therapie stark verändert wird.^{46,113}

Der immunphänotypische Nachweis und die Quantifizierung abnormal exprimierter Oberflächenantigene sowie intrazellulärer Antigene zur Unterscheidung normaler hämatopoetischer Zellen von leukämischen Blasten lässt sich am bes-

ten durch Durchflusszytometrie unter Einsatz möglichst vieler Parameter erreichen.²⁴ MRD-Analysen mithilfe der DC bieten neben der genauen Quantifizierung den Vorteil der schnellen Durchführbarkeit und die Messung einer großen Anzahl von Zellen. Zusätzlich lassen sich bei durchflusszytometrischen Analysen gleichzeitig Informationen über den Status der normalen hämatopoetischen Zellen gewinnen. Die Reliabilität dieser Methode ist abhängig von der Anzahl und Stabilität der zur Verfügung stehenden Antikörperkombinationen. Je mehr Antikörper eingesetzt werden können, desto besser können Änderungen des Immunphänotyps (immunophenotypic switches) der leukämischen Zellen kompensiert werden. Verschiebungen im leukämiespezifischen Immunphänotyp stellen analog zur variablen Dominanz eines bestimmten Klons bei der PCR-gestützten Analyse (s. oben) einen Nachteil dieser Methode dar.^{6,32,48,115} Die MRD mittels DC erfordert außerdem besondere technische Erfahrung bei der Verarbeitung der Zellen, um Kontaminationen zu verhindern, darüberhinaus gute Expertise bei der Auswahl der Antikörperkombinationen und Kenntnis über die unterschiedlichen immunphänotypischen Markerkombinationen von physiologischen und regenerierenden Zellen des Knochenmarks, insbesondere von frühen, d.h. noch undifferenzierten KM-Zellen.²⁶ Die Sensitivität der DC für den Einsatz zu MRD-Analysen unter praktischen Bedingungen ist in mehreren Studien von Campana und Coustan-Smith et al. belegt und wird mit 10^{-3} bis 10^{-4} angegeben, was einer Detektion von einer leukämischen Zelle unter 1.000 bis 10.000 Zellen entspricht.^{26,35} Dabei ist die erreichte Sensitivität abhängig vom Grad der immunphänotypischen Abweichung der leukämischen von normalen Zellen und der zur Verfügung stehenden Gesamtzellzahl. Campana und Coustan-Smith et al. zeigten, dass für > 90 % aller untersuchten ALL-Patienten immunphänotypische Marker für ein Monitoring der MRD bei einer Sensitivität von 10^{-4} identifiziert werden konnten.^{26,35} Für AML-Patienten konnten wie oben beschrieben in 93 % der Fälle Marker identifiziert werden, wobei aufgrund einer partiellen Überschneidung bestimmter Immunphänotypen normaler hämatopoetischer Zellen mit dem leukämischer Zellen in rund 40 % der Fälle nur eine Sensitivität von 10^{-3} erreicht werden konnte.³⁴ Dafür zeigte sich bei der Untersuchung von 41 ALL-Patienten, die ein klinisches Rezidiv erlitten hatten, eine

gute Stabilität der identifizierten Marker in der Persistenz von mindestens einer immunphänotypischen Markerkombination bei 33 Patienten (80,5 %).²⁶

Wenn man annimmt, dass das Ergebnis einer MRD-Analyse eng mit der Anzahl leukämischer Zellen in einer Probe korreliert, ist zu erwarten, dass sich in einem Vergleich der unterschiedlichen Methoden konkordante Ergebnisse erzielen lassen. Eine 2005 durchgeführte Studie von Kerst et al. vergleicht die MRD-Analyse durch die beschriebenen Methoden in direktem Vergleich bei einem Kollektiv von 45 ALL-Patienten (37 B-ALL, 8 T-ALL). In der Studie erzielten DC und RT-PCR annähernd konkordante Ergebnisse. Auch bei allen acht untersuchten T-ALL-Patienten konnten geeignete Immunphänotypen für die MRD-Analyse per DC identifiziert werden. Durchflusszytometrisch konnten in 41 Fällen (91 %) leukämieassoziierte immunphänotypische Marker bei einer Sensitivität von 10^{-4} identifiziert werden, was sehr gut zu obenstehenden Ergebnissen von Campana und Coustan-Smith korreliert. Die quantitative real-time-PCR erreichte in 38 Fällen (84 %) die Identifikation von mindestens einem Antigen-Rezeptor-Genrearrangements bei einer Sensitivität von mindestens 10^{-4} . Die Kombination beider Methoden erlaubte ein MRD-Monitoring in 100 % der Fälle. Für beide Methoden ergaben sich allerdings auch Limitationen: Bei der DC war die Zahl eingesetzter Antikörperkombinationen, bei der real-time-PCR das Panel eingesetzter Primer begrenzt. In 105 Follow-Up-Proben zeigten sich die gemessenen MRD-Ergebnisse hochkonkordant (Bland-Altman-Abweichung < 5).⁶³ Eine andere Studie von Neale et al. belegt diese Beobachtungen an einem noch größeren Kollektiv von insgesamt 227 pädiatrischen B-ALL-Patienten mit 1375 Proben, wovon 736 Proben KM-Aspirationen waren. Auch hier korrelierten die Ergebnisse von DC-MRD und PCR-MRD sehr gut: Bei 1329 der 1375 Proben (96,7 %) stimmte die Zuordnung der Ergebnisse in die MRD-Bereiche $\geq 0,01$ % bzw. $< 0,01$ % überein, lediglich in 28 Fällen (2,0 %) zeigte die DC-MRD ein Ergebnis von $\geq 0,01$ % an, die PCR-MRD dagegen ein Ergebnis von $< 0,01$ %. Die Kombination beider Methoden ermöglichte auch hier ein MRD-Monitoring für alle Patienten.⁸⁰

Beide Methoden zu kombinieren erscheint also als das beste Vorgehen, jedem Patienten ein geeignetes MRD-Monitoring anzubieten und gleichzeitig falsch

positive Ergebnisse zu minimieren. Die praktische Umsetzung einer routinemäßigen kombinierten Anwendung beider Methoden für jeden Patienten dürfte jedoch vor dem Hintergrund der hohen Arbeitsbelastung und der damit verbundenen hohen Kosten sowie dem stets begrenzten Probenmaterial kaum realisierbar sein, so dass wohl weiterhin zwischen den beiden Methoden priorisiert werden wird. Als Vorteil der Durchflusszytometrie lässt sich die breitere Verfügbarkeit von FACS-Geräten in klinischen Zentren anführen, doch die Durchführung einer MRD-Analyse per DC erfordert Expertenwissen der Immunphänotypisierung und Interpretation der Ergebnisse sowie eine anspruchsvolle technische Umsetzung der Tests, da sich sonst eine relativ hohe Bias einstellt.²⁶ DC lässt sich jedoch in den meisten Fällen schneller durchführen als eine PCR-Analyse, was insbesondere in frühen Therapiestadien wie beispielsweise an Tag 15 einen Vorteil gegenüber der PCR bedeutet, da die Entwicklung eines geeigneten PCR-Assays bis zu zwei Wochen dauern kann. Gegen Ende der Therapie kann es dagegen aufgrund der höheren Sensitivität der PCR in manchen Fällen möglich sein eine MRD-Last nachzuweisen, die durchflusszytometrisch nicht detektierbar ist.²³ Was die Kosten betrifft, werden für beide Methoden im Gesamten ähnliche Angaben gemacht.⁶³

Abschließend lässt sich sagen, dass sich für die ALL eine konkurrierende Situation der Methoden ergeben hat, wohingegen bei AML-Patienten die MRD per Durchflusszytometrie aufgrund der weit höheren Anwendbarkeit vorrangig ist.

1.3.2.3 Korrelation der MRD mit dem klinischen Verlauf

Die prognostische Bedeutung der durchflusszytometrisch analysierten MRD und deren Korrelation mit dem klinischen Verlauf sind in mehreren Studien sowohl für die ALL als auch für die AML belegt.^{14,32,35,36,38} Es konnte gezeigt werden, dass eine MRD von $< 0,01$ % Blasten (dies entspricht der in der Praxis angegebenen Nachweisgrenze der MRD per DC) im Knochenmark zu jedem Zeitpunkt der Therapie mit einem signifikant niedrigeren 5-Jahres-Rezidivrisiko assoziiert ist: In einer im Jahr 2002 durchgeführten Studie von Coustan-Smith et al. wurden KM-Analysen von 110 ALL-Patienten an Tag 19 nach Beginn der Induktionstherapie untersucht. Bei den darunter MRD-negativen Patienten (51

mit MRD < 0,01 %) zeigte sich ein 5-Jahres-Risiko für Rezidiv oder Therapieversagen von 6 % ± 3,4 %, bei den 59 Patienten mit MRD ≥ 0,01 % ein Risiko von 32,2 % ± 6,5 % mit statistischer Signifikanz ($p < 0,001$).³⁵ Ein noch größeres Kollektiv von insgesamt über 2100 pädiatrischen B-ALL-Patienten wurde 2008 von Borowitz et al. mittels MRD-Analysen von KM nach Abschluss der Induktionstherapie und peripheren Blutproben 1 Woche nach Einleitung der Induktionstherapie untersucht. Es zeigte sich konkordant zu den Untersuchungen von Coustan-Smith et al. ein von Therapiestadium und Risikogruppe unabhängiges schlechteres event-free-survival für Patienten mit nachgewiesener MRD-Last von ≥ 0,01 %. Dabei stellten sich die Ergebnisse der analysierten KM-Proben als der wichtigste prognostische Faktor heraus und es gelang darüber hinaus mithilfe der MRD sowohl frühe als auch späte Rezidive besser vorherzusehen.¹⁴

Konkordant zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen MRD-Messungen zeigte sich auch in mehreren Untersuchungen der MRD mittels quantitativer PCR eine bedeutsame Korrelation der MRD mit dem klinischen Verlauf.^{20,30,43,114,120} In der multizentrischen Studie AIEOP-BFM ALL 2000 wurden ALL-Patienten mithilfe der quantitativen PCR in drei Gruppen (Standard-, Mittel- und Hochrisikogruppe) eingeteilt und das 10-Jahres-event-free-survival von Flohr et al. analysiert und 2008 publiziert. Für die Standard-Risikogruppe zeigte sich ein 10-Jahres-event-free-survival in 93 % der Fälle, für die Mittel-Risikogruppe in 74 % und für die Hochrisikogruppe in 16 % der Fälle. Wie oben bereits erwähnt, war die PCR-basierte MRD-Analyse mangels ausreichender „Targets“ in manchen Fällen nicht durchführbar: Eine MRD-gestützte Einteilung gelang in dieser Studie für 2594 von insgesamt 3341 Patienten (78 %).⁴³ Als geeignetster Schwellenwert für die Vorhersage eines 5-Jahres-Rezidivrisikos konnte eine MRD-Last von 0,1 % identifiziert werden (72 % für Patienten über diesem Wert, 12 % für Patienten mit niedrigerem Level, $n = 284$, $p < 0,001$).¹²⁰ Die PCR-gestützte Bestimmung der MRD erlaubt überdies prädiktive Aussagen über das Outcome stammzelltransplantierter Patienten.^{4,51,65,66,107,111} Bader et al. zeigten 2002 für ALL-Patienten, die eine T-Zell-depletierte Stammzelltherapie erhielten, dass eine hohe MRD-Last von 0,1 - 1 % vor Stammzelltransplan-

tation (SZT) mit einem erhöhten Rezidivrisiko nach SZT assoziiert ist: Insgesamt 41 Patienten in erster oder höherer Remission vor SZT wurden nach MRD-Last in drei Gruppen eingeteilt (MRD-hochpositiv, MRD-niedrigpositiv und MRD-negativ) und das 5-Jahres-event-free-survival analysiert. Die Resultate waren mit 78 % für 14 MRD-negative Patienten, 48 % für 10 MRD-niedrigpositive und 23 % für 17 MRD-hochpositive Patienten statistisch signifikant ($p = 0,022$).⁴

Unabhängig von der Messung per PCR oder DC konnte für das MRD-Monitoring auch bei ALL-Patienten in zweiter klinischer Remission eine signifikante Risikostratifizierung für ein zweites Rezidiv nachgewiesen werden.^{33,40} Coustan-Smith et al. zeigten für MRD-negative Patienten in zweiter klinischer Remission ein 2-Jahres-Rezidivrisiko von 28 %, für Patienten mit einer MRD $\geq 0,01$ % ein Risiko von 70 % ($n = 35$, $p < 0,01$). Dabei waren Zeitpunkt des ersten Rezidivs und MRD die zwei signifikanten Prädiktoren.³³

Etwas weniger ausführlich, auch aufgrund der niedrigeren Inzidenz, wurden besonders in den letzten Jahren Studien zur Situation bei AML-Patienten durchgeführt. Die prognostische Signifikanz der MRD hinsichtlich des klinischen Verlaufs konnte auch hier für sowohl durchflusszytometrische^{22,27,94,117} Messungen als auch Messungen per (RT-)PCR^{71,76,105} belegt werden. Sievers et al. wiesen 2003 in MRD-Messungen mittels DC ein 4,8-fach erhöhtes Rezidivrisiko für klinisch remittierte, jedoch MRD-positive de novo AML-Patienten ($n = 252$, 41 MRD-positive) sowie ein 3,1-fach erhöhtes Risiko zu sterben nach. Die Ergebnisse waren hochsignifikant ($p = 0,0001$).⁹⁷ Langebrake et al. zeigten 2006 an 150 Patienten mit neu diagnostizierter AML ein signifikant niedrigeres 3-Jahres-event-free-survival in den Fällen mit mehrfach per DC detektierbaren Blasten ($71 \% \pm 6 \%$ versus $48 \% \pm 9 \%$ und im weiteren Verlauf $70 \% \pm 6 \%$ versus $50 \% \pm 7 \%$, p stets $< 0,033$).⁶⁸ Bei beiden Studien war wiederum die MRD der wichtigste Prädiktor für den klinischen Verlauf.

1.3.2.4 Schlussfolgerungen

Die dargestellten Studien belegen die prognostische Bedeutung der MRD für den klinischen Verlauf und den Zusammenhang der MRD-Last mit dem Thera-

pieansprechen bei kindlichen Patienten mit neu diagnostizierter oder rezidivierter ALL und AML sowie vor und nach SZT. Mit der kombinierten Anwendung beider Methoden (DC und PCR) lassen sich heute für nahezu alle Patienten immunphänotypische Marker bzw. Targets identifizieren, um ein MRD-Monitoring zu ermöglichen. Insbesondere beim Nachweis der minimalen Resterkrankung einer AML zeigt sich die DC als das häufiger anwendbare Verfahren. Bei ALL-Patienten besitzt die DC noch einen leichten Vorsprung gegenüber der PCR durch die etwas häufigere Anwendbarkeit, die schnellere Durchführbarkeit und die Mitbeurteilung der normalen Zellen der Hämatopoese trotz der in der Regel etwas geringeren Sensitivität (siehe oben). Um MRD-Tests weitläufiger zu etablieren und die Zahl benötigter Antikörper zu reduzieren, bedarf es einer höheren Standardisierung der Testpanels. Diesen Ansatz verfolgten wir in der vorliegenden Arbeit unter Ausnutzung der Vorteile weiter, die moderne Durchflusszytometer mit neun oder mehr parallel detektierbaren Parametern bieten.

1.4 Studienziel

Als erstes Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der MRD-Bestimmung von B-ALLs am FACSCalibur™ Durchflusszytometer vorgesehen, um dadurch eine valide Datenbasis aus klinischen Proben für die weiteren Untersuchungen zu haben. Die Arbeiten hierzu bauten auf Vorarbeiten von MRD-Analysen durch Herrn Dr. Gunter Kerst der Universitätskinderklinik Tübingen auf, die bis zum Jahre 2005 durchgeführt wurden. Für die Optimierung galt es, zunächst weitere gesunde Vergleichsproben (Templates) nach zeitlichem Eingang und Verfügbarkeit zu verarbeiten. Zeitgleich war die Entwicklung von Gating-Strategien und Korrekturfaktor-Berechnungen zur korrekten Auswertung der einzelnen Marker von großer Bedeutung. Zur Erweiterung der Möglichkeiten der MRD-Bestimmung mittels immunologischer Marker sollte die Integration von HLA-Markern in die Messpanels für dieses Gerät überprüft werden.

Im Anschluss daran sollten die etablierten MRD-Messungen auf das Durchflusszytometer BD LSR II übertragen werden. Durch den Transfer der MRD-Bestimmung auf das neue Gerät sollten die erweiterten Messoptionen ausge-

schöpft werden können, die dieses Gerät bietet. Dazu zählen neben der schnelleren Messgeschwindigkeit des Geräts hauptsächlich die Steigerung der Zahl gleichzeitig detektierbarer Fluorochrom-markierter Antikörper und dadurch die Einsparung von benötigtem Probenmaterial bei überlinearer Zunahme der gewonnenen Information.

Vor diesem Hintergrund mussten sowohl wissenschaftliche als auch technische Herausforderungen und Fragestellungen gelöst werden. Die methodische Beschreibung der Etablierung von MRD-Analysen aus Patientenmaterial (KM) und die Auswertung erster Messungen von Patientenproben mit Blick auf den klinischen Verlauf unserer Patienten am neuen Durchflusszytometer stellen infolgedessen den Hauptteil der vorliegenden Arbeit dar. Neben der klassischen, immunophänotypischen Bestimmung von Oberflächenmarkern und intrazellulären Antigenen sollten im Rahmen der MRD-Messungen am neuen Cytometer gleichzeitig die Vitalität leukämischer Blasten und das Einsatzpotential neuer UV-Fluorochrome untersucht werden, um die Messungen auf diese Weise noch sensitiver zu machen und Optionen für die Bestimmung weiterer Eigenschaften wie z.B. Stammzellcharakteristika der leukämischen Blasten zu haben.

2 Patienten und Material

2.1 Definition und Herkunft der Patientenproben

Als Probenmaterial verwendeten wir heparinisiertes Knochenmark, vereinzelt auch EDTA-Knochenmark, welches wir innerhalb weniger Stunden nach Punktion von der hämatologisch-onkologischen Station, der Tagesstation, der KMT-Routine oder der hämatologisch-onkologischen Ambulanz erhielten. Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte zu diagnostischen Zwecken zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie zu vorhersehbaren Terminen gemäß des in Tübingen etablierten Behandlungsprotokolls BFM-ALL 2000 und zu unvorhersehbaren Terminen, beispielsweise im Falle eines Rezidiv-Verdachts oder akuten Rezidivs. Sofern eine Einverständniserklärung zur Verwendung von überschüssigem Knochenmark zu Forschungszwecken vorlag, verwendeten wir einen Teil des entnommenen Knochenmarks für die vorliegende Untersuchung.

In einzelnen Fällen, vor allem während unserer Vorversuche, färbten und analysierten wir auch aus peripherem Blut isolierte mononukleäre Zellen, sofern kein Knochenmark verfügbar war. Die eigentlichen und klinisch relevanten Messungen erfolgten für B-ALLs jedoch stets an Knochenmark, aus welchem wir unmittelbar nach Erhalt die mononukleären Zellen isolierten (s. Methoden).

2.2 Ein-/Ausschlusskriterien der Patientenproben

Für unsere Studie erhielten wir Material von Patienten, die während den Jahren 2007 bis 2009 in der Tübinger Universitätskinderklinik aufgrund einer Erstdiagnose oder eines Rezidivs von einer der folgenden Diagnosen behandelt wurden und von denen ausreichend Probenmaterial zur Verfügung stand:

Erkrankung	Subtypen
Akute lymphoblastische Leukämie	prä-B/reife B-ALL
	c-ALL
	T-ALL

Akute myeloische Leukämie	AML M0-M7
Biphänotypische Leukämien	
Bilineare Leukämien	

Tab. 2.1: Eingeschlossene Diagnosen

Nicht für die Studie verwendet wurden Patienten die an einer CML, CLL, JMML, einem NHL oder einem Lymphom mit weniger als 25% Blasten erkrankt waren.

2.3 Kontrollproben

Um unsere Messungen zu verifizieren und um geeignete Färbungen und Auswertungen etablieren zu können, wurde zusätzlich gesundes oder sich in Regeneration befindliches nicht leukämisches Knochenmark benötigt. Für diese Kontrollen kam Material von Patienten in Frage, die zu Zwecken des Ausschlusses einer Leukämie, aufgrund anderer onkologischer Krankheitsbilder oder aufgrund von nicht onkologischen Erkrankungen wie z.B. Rheuma punktiert wurden. Eine Punktion gesunder Kinder kam aus ethischen Gründen nicht in Frage. Diese Proben gesunden oder regenerierenden Knochenmarks, sogenannte Template-Proben, setzten sich wie folgt zusammen:

Lfd. Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose
1	6 J.	m	Autoimmunerkrankung, infektiöses KM
2	15 J.	w	Osteosarkom
3	13 J.	w	Rheuma
4	5 J.	w	Isolierte Granulozytopenie
5	11 J.	m	Rhabdomyosarkom
6	14 J.	m	Milde Granulozytopenie
7	13 J.	w	Rheuma
8	8 J.	w	Rheuma

Tab. 2.2: Untersuchte Templates am FACSCalibur Durchflusszytometer

Lfd. Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose
1	6 J.	w	Juvenile idiopathische Arthritis
2	13 J.	w	Ewing-Sarkom
3	1 J.	w	Juvenile idiopathische Arthritis
4	12 J.	m	Juvenile idiopathische Arthritis
5	7 J.	m	Rheuma
6	11 J.	m	Rheuma
7	8 Mon.	m	Ausschluss M. Kostmann
8	13 J.	m	Rheuma
9	14 J.	w	Rheuma
10	13 J.	m	Ewing-Sarkom
11	3 J.	m	Juvenile α -Mannosidose
12	5 J.	m	Neuroblastom IV
13	6 Mon.	w	Metachromatische Leukodystrophie

Tab. 2.3: Untersuchte Templates am LSR II Durchflusszytometer

Neben diesen bereits untersuchten Template-Proben wurden während der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit weitere Proben mit einzuschließenden Diagnosen für zukünftige Färbungen und Analysen bei -80°C kryokonserviert.

2.4 Patientenproben

Gemäß den Ein- und Ausschlusskriterien und den eingeschlossenen Diagnosen für Kontrollpatienten mit physiologischem/regeneratorischem Knochenmark (Template-Proben) setzten sich die erhaltenen Patientenproben wie folgt zusammen:

Insgesamt erhielten wir Probenmaterial von 145 Patienten, darunter befanden sich insgesamt 24 Templates, wovon 21 für Kontrollmessungen untersucht

wurden (siehe Tab. 2.2 und Tab. 2.3). Bei 75 dieser 145 Patienten lagen leukämische Erkrankungen vor, die sich wie folgt zusammensetzten:

Diagnose	Anzahl
c-ALL	49
Prä-B-ALL	2
T-ALL	8
Prä-T-ALL	2
AML	9
CML	3
Biphänotypische Leukämie	1

Tab. 2.4: Diagnosenverteilung der Leukämiepatienten (n=75)

Bei insgesamt 30 von den für diese Arbeit relevanten 49 Patienten mit c-ALL lag jeweils ausreichend Material sowohl vom Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch von späteren (MRD-)Zeitpunkten vor. Die verbleibenden Patientenproben wiesen entweder zu geringe Qualität, zu geringe Zellzahlen oder andere Diagnosen auf und wurden für andere Tests am FACSCalibur und LSR II Durchflusszytometer genutzt oder kryokonserviert. Die Etablierung der MRD am LSR II Durchflusszytometer erfolgte für Patienten, die an einer B-ALL erkrankt waren. Bei den 30 untersuchten B-ALL Proben zeigte sich folgende Altersverteilung:

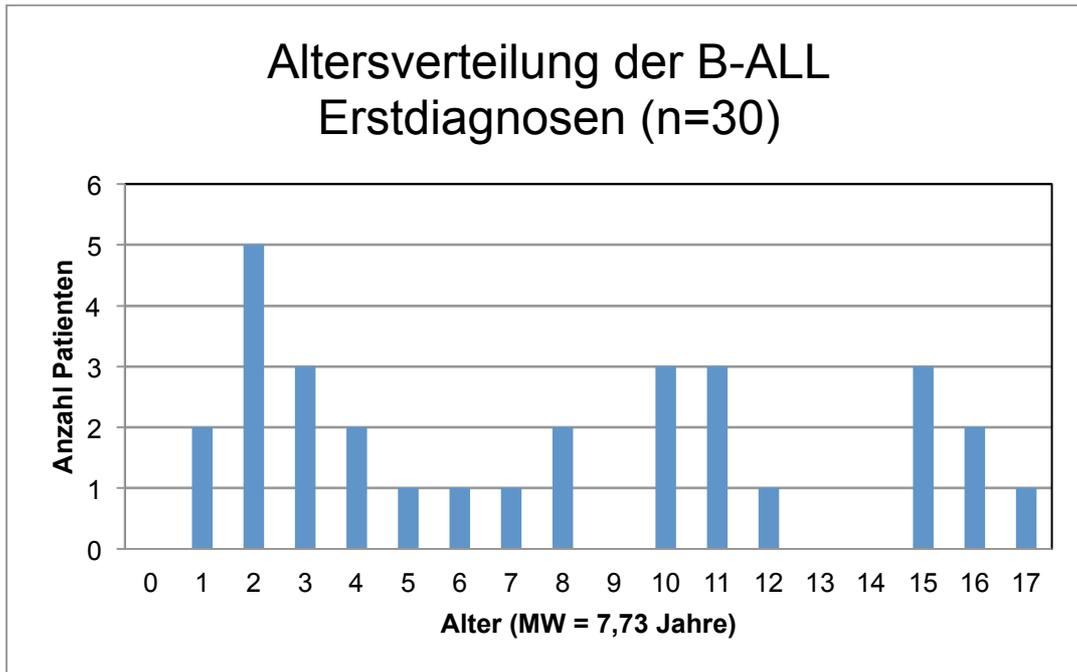


Abb. 2.1: Altersverteilung der untersuchten B-ALL Erstdiagnosen (n=30)

2.5 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

In unserem Labor wurden die folgenden Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Material	Hersteller
Sterile Werkbank Hera safe Typ HS12	Heraeus
Beheizbares Wasserbad Typ WB7	Memmert
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Zentrifuge Micro 22R	Hettich
Blutanalysegerät Cellcounter Advia 120	Bayer
Durchflusszytometer FACSAria	BD Biosciences
Kühlschrank profi-line (+4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-25°C)	Bosch

Patienten und Material

Gefrierschrank -86°C Freezer (-80°C)	Forma Scientific
Vortexer Reox Top	Heidolph
Schüttler MTS 2	Janke & Kunkel
Feinwaage Typ AC210S-001	Sartorius
Waage 500 g Typ 1002MP9	Sartorius
Pipettiergerät Pipetboy Plus	Integra Biosciences
Sterile Plastikpipetten 1/2/5/10/25/50 ml	Costar
Verstellbare Pipetten Pipetman 10/20/100/200/1000 µl	Gilson
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen Ultratip 1000 µl	Greiner bio-one
Transferpipetten Pasteurplastpipetten 170 mm, 2,5 ml	Ratiolab
Falcon-Röhrchen Cellstar PP-Test tubes 15/50 ml	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden	Becton Dickinson
FACS-Röhrchen 5 ml, Rundboden	Sarstedt
Zellsiebe für FACS-Röhrchen Cellstrainer Cap 12x75 mm style	Becton Dickinson
Parafilm „M“	American National Can
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf
Kryoröhrchen CryoTube™ Vials, 1,8 ml	Nunc A/S
Spritzen, steril 5/10/20 ml	Braun
Kanülen Sterican 20/22 G	Braun
Zellsiebe Falcon Cell Strainer 40 µm Nylon	Becton Dickinson

Butterfly 19/20 G	Venisystems
Vakuum-Filtersystem Vacuum Driven Disposable Filtration System	Millipore

Tab. 2.5: Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.6 Verwendete Chemikalien

Für unsere Experimente und Messungen wurden die nachfolgenden Chemikalien erworben:

Produkt	Hersteller
FCS (fetales Kälber-Serum) inaktiviert (30 min bei 56 °C)	Biochrom AG
BSA (Bovines Serum Albumin)	SIGMA
Natriumazid 10% Lösung in H ₂ O	SIGMA
EDTA	SIGMA
Biocoll Separating Solution, Ficoll Density 1,077 g/ml	Biochrom AG
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Cambrex
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Cambrex
VLE RPMI 1640	Biochrom AG
HEPES (RPMI + L-Glutamin)	Biochrom AG
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) 1x/10x	Lonza
Einfrierlösung	Baxter

Human-Albumin 20 %	Biotest
FACSFlow FACSClean FACSRinse	Becton Dickinson
Paraformaldehyd, Pulver	SIGMA
Trypanblau Lösung	SIGMA
8E Reagenz	St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN (USA)

Tab. 2.6: Verwendete Chemikalien

2.7 Verwendete Stammlösungen

Als Stammlösungen bezeichneten wir Lösungen aus mehreren Stoffen, die für unsere Experimente in unterschiedlicher Verdünnung von Bedarf waren und in regelmäßigen Abständen neu angesetzt wurden. Die folgende Tabelle listet Stammlösungen und ihre jeweiligen Inhaltsstoffe auf (näheres zu ihrer Herstellung siehe Methodenteil):

Stammlösung	Inhaltsstoffe
Einfriermedium	RPMI 1640 FCS DMSO
Auftaulösung	RPMI 10% FCS
PBSA	10x DPBS H ₂ O dest. BSA Natriumazid
PFA	DPBS Paraformaldehyd

Wash buffer	DPBS EDTA BSA FCS Natriumazidlösung
SP Puffer	DMEM 10% FCS HEPES

Tab. 2.7: Stammlösungen und Inhaltsstoffe

2.8 MRD-Reagenzien

2.8.1 Fluorochrom-konjugierte Antikörper

Unsere Messungen der minimalen Resterkrankung erforderten eine große Auswahl monoklonaler, teils auch polyklonaler Antikörper, um die notwendigen individuellen Färbungen jedes Patienten durchführen zu können. Die folgenden Tabellen geben die eingesetzten, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörper und ihre zugehörigen Isotypen wieder:

FITC-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD2-FITC	S5.2	Mouse IgG2a	Becton Dickinson
CD3-FITC	UCHT1	Mouse IgG1	Dako
CD5-FITC	DK23 MEM-32	Mouse IgG1	Dako Exbio
CD7-FITC	4H9 MEM-186	Mouse IgG2a	Becton Dickinson Exbio
CD10-FITC	SS2/36	Mouse IgG1	Dako
CD11b-FITC	Bear1	Mouse IgG1	Beckman Coulter
CD13-FITC	WM-47	Mouse IgG1	Dako
CD14-FITC	MEM-15 MEM-18	Mouse IgG1	Exbio

Patienten und Material

CD15-FITC	MMA MEM158	Mouse IgM	Becton Dickinson Exbio
CD19-FITC	4G7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD21-FITC	BL13	Mouse IgG1	Beckman Coulter
CD22-FITC	S-HCL-1	Mouse IgG2b	Becton Dickinson
CD33-FITC	WM-54	Mouse IgG1	Dako
CD34-FITC	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD38-FITC	T16	Mouse IgG1	Beckman Coulter
CD41-FITC	MEM-06	Mouse IgG1	Exbio
CD45-FITC	2D1	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD58-FITC	AICD58	Mouse IgG2a	Beckman Coulter
CD64-FITC	22	Mouse IgG1	Medarex
CD65s-FITC	VIM2	Mouse IgM	Caltag
CD66c-FITC	KOR-SA3544	Mouse IgG1	Beckman Coulter
TdT-FITC	HT-6	Mouse IgG1	ITK Diagnostics
HLA-DR-FITC	L243	Mouse IgG2a	Becton Dickinson
A2 ²⁸ -FITC	FH0037	Mouse IgG2a	One Lambda
Bw4-FITC	FH0007	Mouse IgG2a	One Lambda
MPO-FITC	5B8	Mouse IgG1	Becton Dickinson
Mouse IgG1-FITC	X40 DAK-GO1		Becton Dickinson Dako
Mouse IgG2a-FITC	DAK-O9		Dako
Mouse IgG2b-FITC	PLRV219 DAK-O9		Exbio Dako
Mouse IgM-FITC	DAK-GO8		Dako

Tab. 2.8: FITC-konjugierte Antikörper

PE-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD1a-PE	HI149	Mouse IgG1	Exbio
CD3-PE	UCHT1	Mouse IgG1	Dako
CD5-PE	DK23	Mouse IgG1	Dako
CD10-PE	SS2/36	Mouse IgG1	Dako

CD11b-PE	MEM-174	Mouse IgG2a	Exbio
CD13-PE	L138	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD14-PE	MoP9	Mouse IgG2b	Becton Dickinson
CD16-PE	B73.1	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD38-PE	HB-7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD54-PE	1H4	Mouse IgG2b	Exbio
CD56-PE	MY31	Mouse IgG1	Becton Dickinson
	MEM-188	Mouse IgG2a	Exbio
CD58-PE	MEM-63	Mouse IgG1	Exbio
CD79a-PE	HM57	Mouse IgG1, κ	Dako
CD107a-PE	B-T47	Mouse IgG1	Exbio
CD117-PE	95C3	Mouse IgG1	Beckman Coulter
NG2-PE	7.1	Mouse IgG1	Beckman Coulter
Mouse IgG1-PE	X40		Becton Dickinson
	DAK-GO1		Dako
Mouse IgG2a-PE	PPV-04		Exbio
	DAK-O9		Dako
Mouse IgG2b-PE	PLRV219		Exbio

Tab. 2.9: PE-konjugierte Antikörper

PerCP-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3-PerCP	SK7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD10-PerCP	MEM-78	Mouse IgG1	Exbio
CD14-PerCP	MoP9	Mouse IgG2b	Becton Dickinson
CD34-PerCP	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD38-PerCP	HIT2	Mouse IgG1	Exbio
Mouse IgG1-PerCP	X40		Becton Dickinson

Tab. 2.10: PerCP-konjugierte Antikörper

APC-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD1a-APC	HI149	Mouse IgG1	Exbio
CD5-APC	DK23	Mouse IgG1	Dako

CD3-APC	SK7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD19-APC	SJ25C1	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD33-APC	P67.6	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD34-APC	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD79a-APC	HM47	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD107a-APC	B-T47	Mouse IgG1	Exbio
CD117-APC	A3C6E2	Mouse IgG1	Miltenyi
CD133/1-APC	AC145	Mouse IgG1	Miltenyi
HLA-DR-APC	L243	Mouse IgG2a	Becton Dickinson
Mouse IgG1-APC	X40 DAK-GO1		Becton Dickinson Dako
Mouse IgG2a-APC	PPV-04		Exbio
Mouse IgG2b-APC	PLRV219 DAK-O9		Exbio Dako

Tab. 2.11: APC-konjugierte Antikörper

AlexaFluor 488-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD107a-AF488	B-T47	Mouse IgG1	Exbio
Mouse IgG1-AF488	PPV-06		Exbio
Mouse IgG2a-AF488	PPV-04		Exbio

Tab. 2.12: AlexaFluor 488-konjugierte Antikörper

AlexaFluor 700-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
HLA-DR-AF700	MEM-12	Mouse IgG1	Exbio
CD3-AF700	MEM-57	Mouse IgG2a	Exbio
CD10-AF700	MEM-78	Mouse IgG1	Exbio
CD16-AF700	LNK16	Mouse IgG1	Exbio
CD38-AF700	HIT2	Mouse IgG1	Exbio
CD45-AF700	MEM-28	Mouse IgG1	Exbio
CD58-AF700	MEM-63	Mouse IgG1	Exbio
Mouse IgG1-AF700	PPV-06		Exbio
Mouse IgG2a-AF700	PPV-04		Exbio

Tab. 2.13: AlexaFluor 700-konjugierte Antikörper

Pacific Blue-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3-PB	MEM-57	Mouse IgG2a	Exbio
CD4-PB	MEM-241	Mouse IgG1	Exbio
CD5-PB	CRIS1	Mouse IgG2a	Exbio
CD7-PB	MEM-18b	Mouse IgG1	Exbio
CD10-PB	MEM-78	Mouse IgG1	Exbio
CD19-PB	LT19	Mouse IgG1	Exbio
CD38-PB	HIT2	Mouse IgG1	Exbio
CD45-PB	MEM-28 HI30	Mouse IgG1	Exbio Caltag
CD58-PB	MEM-63	Mouse IgG1	Exbio
HLA-DR-PB	MEM-12	Mouse IgG1	Exbio
Mouse IgG1-PB	PPV-06		Exbio
Mouse IgG2a-PB	PPV-04		Exbio

Tab. 2.14: Pacific Blue-konjugierte Antikörper

Qdot®-konjugierte-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3-Qdot605	UCHT1	Mouse IgG1	Invitrogen
CD3-Qdot655	S4.1	Mouse IgG2a	Invitrogen
CD4-Qdot705	S3.5	Mouse IgG2a	Invitrogen
CD14-Qdot800	TüK4	Mouse IgG2a	Invitrogen
CD45-Qdot800	HI130	Mouse IgG1	Invitrogen
CD56-Qdot605	MEM-188	Mouse IgG2a	Invitrogen

Tab. 2.15: Qdot-konjugierte Antikörper

Tandem-konjugierte-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3-PE-Cy7	SK7	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD33-PE-Cy7	P67.6	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD34-PE-Cy7	8G12	Mouse IgG1	Becton Dickinson
CD10-PE-Dye590	MEM-78	Mouse IgG1	Exbio
CD38-PE-Dye590	HIT2	Mouse IgG1	Exbio
CD19-APC-H7	SJ25C1	Mouse IgG1	Becton Dickinson

Tab. 2.16: Tandem-konjugierte Antikörper

HLA-Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller
A2,28-FITC	H0037	IgG2a	One Lambda
Bw4-FITC	H0007	IgG2a	One Lambda
B7,27-FITC	H1453	IgG	One Lambda
B8-FITC	H0536	IgG2b	One Lambda
B12-FITC	H0066	IgG2b	One Lambda
A1(-Biotin)-APC	H0331	IgM	One Lambda
A3(-Biotin)-APC	H0269	IgM	One Lambda

Tab. 2.17: HLA-Antikörper

Antikörper (Fc-Rezeptor-Blocking)	Hersteller
Normal Rabbit Serum	Invitrogen
Rabbit Immunoglobulin Fraction, Code X0903 für polyklonale Ak	Dako
Gamunex® Human Immunglobulin 10%, für monoklonale Ak, verdünnt 1:5 mit PBSA (2%ige human IgG-Lösung)	Bayer

Tab. 2.18: Antikörper (Fc-Rezeptor-Blocking)

2.8.2 Unkonjugierte Fluorochrome (Lebend/Tot-Marker)

Für die Entwicklung einer Lebend/Tot-Differenzierung und die Etablierung der Ak-Kombinationen (Backbone) testeten wir die folgenden unkonjugierten Fluorochrome:

Reagenz (Dye)	Hersteller
Propidium Iodid (1:200 mit Aq. dest. verdünnt)	Fluka
Pacific Blue	Invitrogen
Hoechst 33342	SIGMA
Vybrant® DyeCycle™ Violet	Invitrogen
Alexa Fluor 350 (A350)	Invitrogen
Alexa Fluor 405 (A405)	Invitrogen

Alexa Fluor 680 (A680)	Invitrogen
Alexa Fluor 700 (A700)	Invitrogen

Tab. 2.19: Unkonjugierte Fluorochrome, testweise verwendet zur Lebend/Tot-Differenzierung und Etablierung der Ak-Kombinationen

2.8.3 Beads

Als Beads bezeichnet man Mikropartikel aus Kunststoff, an die Fluorochrome gekoppelt sind. Wir setzen sie zur wöchentlichen Kalibrierung unserer Durchflusszytometer ein:

Gerät	Bezeichnung	Lot ID
FACSCalibur	CaliBRITE 3™	Unlabeled: 89825I / 37357I FITC: 89822M / 37486L PE: 89823J / 37487H PerCP: 89831K / 37994L
	CaliBRITE APC™	APC: 89827J / 35472J
LSR II	BD Cytometer Setup & Tracking Beads™ (CST-Beads)	08401 / 28574

Tab. 2.20: Cytometer-Beads zur Gerätekalibrierung

2.9 EDV-Software

Software	Hersteller
FCS Express V3 Research Edition	De Novo Software
FACS Diva Software Version 6.1.2	Becton Dickinson
CellQuest Version 3.3	Becton Dickinson

Tab. 2.21: EDV-Software

3 Methoden

3.1 Herstellung der Stammlösungen

3.1.1 Einfriermedium

Für die Herstellung des Einfriermediums mischten wir unter sterilen Bedingungen 2 Teile RPMI Medium ohne Additive mit 2 Teilen FCS. Zu der entstandenen Lösung wurde in einem weiteren Schritt 1 Teil DMSO zugegeben und das fertige Einfriermedium in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquotiert. Die Lagerung des Einfriermediums erfolgte bei +4°C im Kühlschrank.

3.1.2 Auftaulösung

Die Auftaulösung wurde steril angesetzt aus 500 ml RPMI Medium und Zugabe von 10% FCS (v/v). Analog zum Einfriermedium wurde die Auftaulösung nach Bedarf in 50 ml Tubes aliquotiert und die Stammlösung bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.3 PBSA

Aufgrund seiner häufigen Verwendung als Puffer- und Waschlösung in unseren Experimenten stellten wir PBSA in engen Abständen und großen Mengen regelmäßig her. Um 2 Liter dieser Lösung zu erhalten, lösten wir 4 g BSA (bovines Serum-Albumin) mit 40 ml 10%ige Natriumazid-Lösung in 0,4 l destilliertem Wasser. Diesen Schritt führten wir bei Raumtemperatur mithilfe eines Magnetrührers durch. Nach ca. 3 Stunden waren die Stoffe nach Zugabe von 200 ml 10x-PBS unter Rühren vollständig gelöst. Unter leichtem Schütteln gaben wir diese Lösung im nächsten Schritt in eine 2 Liter fassende Vorratsflasche, die zuvor mit 1,4 l destilliertem Wasser befüllt worden war. PBSA lagerten wir lichtgeschützt bei Raumtemperatur und nahmen nach Bedarf Aliquots in 50 ml-Falcon-Tubes ab.

3.1.4 Paraformaldehydlösung (PFA)

Zum Fixieren der gefärbten Zellen stellten wir in 14-tägigem Abstand 0,5%ige Paraformaldehydlösung her. Dazu war vorab die Herstellung von 4%igem PFA als Ausgangslösung (Stock Solution) notwendig. Wir lösten 2 g pulverisiertes PFA in 50 ml PBS in einem Erlenmeyerkolben durch Erhitzen auf ca. 65°C auf einer beheizbaren Platte mit Magnetrührer. Die Öffnung des Erlenmeyerkolbens wurde während des Lösevorgangs mit Aluminiumfolie verschlossen. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur erhielten wir so eine 4%ige PFA Lösung, von welcher wir ein Aliquot von 5 ml steril filtrierten und zu 35 ml PBS gaben, um eine 0,5%ige PFA-Lösung herzustellen. PFA lagerten wir für bis zu maximal 2 Wochen als 4%ige Stammlösung im Kühlschrank und stellten je nach Bedarf Aliquots der 0,5%igen Arbeitslösung in 50 ml-Falcon-Tubes her, die wir bei +4°C im Kühlschrank lagerten. Da PFA bei längerer Lagerung ausfällt, war es notwendig, PFA regelmäßig neu herzustellen.

3.1.5 Waschpuffer

In Kombination mit 8E als Permeabilisierungsreagenz benutzten wir Waschpuffer als Inkubations- und Waschmedium zur intrazellulären Färbung von mononukleären Zellen (MNC). Zur Vorbereitung inaktivierten wir FCS in 50 ml-Falcon-Tubes für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad und froren die Aliquots nach Abkühlen auf Raumtemperatur bei -20°C ein. Daneben stellten wir eine 0,55%ige (w/v) EDTA-Lösung her, indem wir 55 g EDTA in 100 ml destilliertem Wasser lösten und bei Raumtemperatur lagerten.

Um 1 Liter Waschpuffer herzustellen, tauten wir ein 50 ml-Aliquot mit inaktiviertem FCS auf. Unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers lösten wir 15 g BSA in 20 ml 10%iger Natriumazidlösung mit 70 ml sterilem Wasser und 10 ml 10x-PBS unter Rühren für ca. 5 Stunden. Anschließend gaben wir zu dieser Lösung 50 ml des aufgetauten inaktivierten FCS sowie 10 ml der 0,55%igen EDTA-Lösung dazu und füllten mit 840 ml PBS auf 1000 ml auf. Für den Einsatz zu MRD-Zwecken musste diese Lösung zweimal durch einen 0,2 µm-Filter filtriert werden und konnte anschließend für die Dauer von maximal einem Monat bei

+4°C im Kühlschrank lichtgeschützt aufbewahrt oder bei -20°C eingefroren werden.

3.2 Vorbereitung und Bearbeitung der Patientenproben

3.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Die Isolierung der mononukleären Zellen (MNC) einer Knochenmarkprobe war der erste Schritt für die Weiterverarbeitung des Materials, da unsere Experimente auf Leukozyten als Zielzellen ausgerichtet waren. MNCs lassen sich aus Blut oder Knochenmark auf zwei Arten isolieren: Die Durchführung einer Lysis, die darauf abzielt Erythrozyten zu lysieren und andere Zellen wie Granulozyten nicht isoliert und andererseits die Isolation von MNCs durch Ficoll, einer käuflichen Lösung, mit der eine Zellseparation aufgrund eines Dichtegradienten erfolgt. Während die meisten unserer Versuchszellen durch Ficoll isoliert wurden, wandten wir zu Vergleichszwecken und bei speziellen Fragestellungen jedoch auch die Lysis-Methode an. Für die Isolation mononukleärer Zellen mit Ficoll etablierten wir folgendes Protokoll (angelehnt an Boyum et al.¹⁵):

1. Bestimmung des Probenvolumens (KM) mit einer sterilen Glaspipette.
2. Überführung des Probenmaterials in ein 50 ml-Falcon-Tube und Verdünnen mit PBS bis zu einem Verhältnis von 2:1, bei älterem Knochenmark auch bis 3:1, bei peripherem Blut im Verhältnis 1:1. Dabei Auswaschen des ursprünglichen Probenröhrchens mit PBS, um alle Zellen überführen zu können.
3. Verdünnte Lösung durch einen 40 µm Filter in ein neues 50 ml-Falcon-Tube filtrieren um evtl. Verklumpungen oder Gerinnsel herauszufiltern.
4. Je nach Menge an Material zwei oder mehr 15 ml Falcons mit je 4 ml Ficoll-Lösung befüllen und vorsichtiges Aufschichten des Probenmaterials um grobe Vermengungen zu vermeiden. Probenmaterial gleichmäßig auf die Ficoll-Röhrchen verteilen.
5. Zentrifugation für 30 Minuten bei 400 G und Raumtemperatur.

6. Pro Falcon-Tube ein neues Falcon-Tube vorbereiten und dieses nach der Zentrifugation mit der durch eine Transferpipette abgenommenen Schicht mononukleärer Zellen über der Ficoll-Schicht befüllen.
7. Auffüllen der Falcon-Röhrchen mit PBS (anschließende AF350 Färbung) bzw. PBSA (kein AF350) bis 14 ml.
8. Zentrifugation für 5 Minuten bei 450 G und RT.
9. Überstand von jedem Röhrchen abkippen und die Röhrchen auf 1 ml auffüllen, anschließend alle Zellsuspensionen in einem Falcon-Röhrchen zusammenführen (pooling).
10. Auffüllen auf 7,5 ml mit PBS bzw. PBSA, resuspendieren mit Transferpipette und Bestimmung der Zellzahl am Advia-Blutanalyse-Gerät mittels eines 250 µl-Aliquots.
11. Berechnung der Zellzahl und Zentrifugation des Falcons für 5 Minuten bei 450 G, RT.
12. Röhrchen abkippen und Zugabe von 3,5 ml PBS bzw. PBSA, anschließend resuspendieren.
13. Überführen in ein 5 ml-FACS-Röhrchen und erneute Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G.

Für die sich anschließende Färbung der Zellen stellten wir die Lösung durch Zugeben eines entsprechenden Volumens von PBSA nach diesem Schritt auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 50 µl für MRD-Messungen, bzw. $0,2 \times 10^6/50 \mu\text{l}$ für B-ALL-Erstdiagnosen oder $0,3 \times 10^6/50 \mu\text{l}$ für T-ALL-Erstdiagnosen ein. Durch die Verfügbarkeit neuer Antikörper und die Ergebnisse der Titrationen dieser Antikörper stellten wir die Zellen für Messungen am LSR II Durchflusszytometer noch konzentrierter bis zu einem Endvolumen von 25 µl pro Test ein und konnten so in den meisten Fällen mit der jeweils halben Menge an Antikörpern arbeiten. Bis zur ihrer Weiterverwendung wurden die Zellen auf Eis zwischengelagert.

3.2.2 Extrazelluläre Färbung der Zellen (direct staining)

Diese Methode beschreibt die Färbung von Oberflächenantigenen auf Zellen durch direkt reagierende Antikörper. Wir definierten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose für jeden unserer Patienten bestimmte Marker, um die MRD im weiteren Verlauf überwachen zu können. Wenn wir Material von bereits anbehandelten Patienten erhielten, prüften wir, ob es im KMT-Routine-Labor kryokonservierte Zellen vom Zeitpunkt der Erstdiagnose gab und färbten diese ggf. nach, um auch diese Patienten mit in den MRD-Verlauf einschließen zu können.

Als MRD-Marker kamen unterschiedliche Zielantigene für unsere Messungen in Frage. Einige davon waren Oberflächenantigene, die wir mit nachfolgend beschriebener Methode auf ihre Expression und Intensität testeten. Dazu wurden für jede eingehende Follow-Up-Patientenprobe vorab die zu untersuchenden Marker definiert und in Abhängigkeit von der ermittelten Zellzahl für die Färbung vorgesehen. Abb. 8.1 (siehe Anhang) illustriert eine solche Planung der zu untersuchenden Marker für eine B-ALL-MRD-Messung am FACSCalibur und LSR II. Für die Menge an Antikörpern, die für die einzelnen Färbungen notwendig waren, orientierten wir uns an den Angaben des Herstellers und dem Ergebnis unserer Titrationsreihen und dosierten entsprechend dem Volumen der Zellsuspension. Wurden aufgrund einer geringen Zellzahl nur die Hälfte der Zellen eingesetzt, so gaben wir analog dazu auch nur die Hälfte der Ak-Menge dazu, d.h. im Röhrchen befand sich in diesem Fall auch insgesamt nur das halbe Volumen. Der Ablauf der extrazellulären Färbung im Einzelnen erfolgte nach folgendem Protokoll (angelehnt an Campana et al.^{27,28}):

1. Vorbereitung und Beschriftung der Test-Röhrchen.
2. Zugabe von 50 µl 2% human IgGs (Gamunex®) für Färbungen mit monoklonalen Antikörpern bzw. 50 µl Rabbit-IgG bei polyklonalen Antikörpern. Enthielt die Probe nur relativ wenig MNCs, so pipettierten wir jeweils nur 25 µl dieser unspezifisch bindenden Antikörper und entsprechend nur die Hälfte der Zellen bei der späteren Zugabe der Zellsuspension. Zuletzt ersetzten wir diese unspezifisch bindenden Antikörper durch Normal-Rabbit-Serum, das wir entsprechend der Zellzahl (1 µl / 10⁶ Zel-

len) zugaben und somit die Fc-Rezeptor-Blockung mit relativ wenig Volumen realisierten.

3. Pipettieren der Antikörper nach obigem Schema in folgender Reihenfolge: FITC, PerCP, APC, PE (FACSCalibur). Für die Multicolor-Färbungen am LSR II Durchflusszytometer wurde zuvor ein Mastermix angesetzt, jedoch nur in der Menge, die für die geplante Färbung benötigt wurde, da die Aufbewahrung dieser Mischung über längere Zeit aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittel der Antikörper nicht zu empfehlen ist.
4. Zugabe der Zellen in Abhängigkeit der Zellzahl (meist 1×10^6 in 50 μ l PBSA) und Vermischen durch Anschneiden. Bedecken der Tubes mit Aluminiumfolie.
5. Inkubation für 10 Minuten bei RT im Dunkeln.
6. Nach Inkubation Zugabe von 3,5 ml PBSA je Test-Tube, invertieren mit Parafilm und direkte Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und RT.
7. Diesen Waschschrift ein weiteres Mal durchführen.
8. Test-Tubes einzeln dekantieren und durch Anschneiden resuspendieren. Zugabe von 80 μ l 0,5%igem PFA zur Fixierung der Zellen und Lagerung bis zur Messung am selben Tag mit Deckel bei +4°C im Kühlschrank.

3.2.3 Intrazelluläre Färbung der Zellen (intracellular staining)

Die Färbung intrazellulärer Antigene setzte zunächst sämtliche Schritte der extrazellulären Färbung voraus, ohne jedoch im letzten Schritt PFA hinzuzugeben. Damit die gegen intrazelluläre Antigene gerichteten Antikörper ins Zellinnere gelangen konnten, war für diese Färbemethode zunächst eine Permeabilisierung der Zellen erforderlich. Nachfolgendes Protokoll (angelehnt an Slaper-Cortenbach et al.^{53,64,87,95,100}) beschreibt die Anfärbung intrazellulärer Antigene:

1. Nach der letzten Waschung der extrazellulären Färbung werden die Test-Tubes abgegossen und 1 ml 8E Reagenz, welches zuvor kurz vortext wurde, dazugegeben.
2. Test-Tubes kurz und bei schwacher Stufe vortexen und für 40 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.

3. Nach der Inkubation direkte Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G (RT).
4. Zugabe von 1 ml Waschpuffer nach Dekantieren des Überstands, kurz vortexen und Inkubation für 10 Minuten bei RT im Dunkeln.
5. Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und RT.
6. Diesen Waschschrift mit 1 ml Waschpuffer wiederholen.
7. Zugabe der intrazellulären Antikörper nach Dekantieren des Überstands.
8. Inkubation mit Deckel für 10 Minuten bei RT im Dunkeln.
9. Zweimaliges Waschen in 1 ml Waschpuffer und zweimalige Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und RT. Zwischen den Waschsritten mit Parafilm invertieren.
10. Nach Dekantieren des Überstands mit 80 µl 0,5%igem PFA fixieren und Zellen bis zur Messung mit Deckel bei +4°C im Kühlschrank lagern.

3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen

Bei einer großen Anzahl isolierter mononukleärer Zellen froren wir Zellen in Kryoröhrchen bei -80°C ein um sie für spätere Nachfärbungen und Experimente wieder auftauen zu können. Um ungefärbte Zellen einzufrieren, verwendeten wir RPMI, von welchem wir 3 ml zu den einzufrierenden ungefärbten MNC in ein FACS-Tube gaben. Es erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und RT. Dieser Waschschrift in 3 ml RPMI wurde zwei weitere Male wiederholt. Währenddessen wurden die Kryoröhrchen mit Datum, Name, Diagnose, Zellen (z.B. KM-MNC bzw. PB-MNC) und Zellzahl beschriftet und mit 500 µl Einfriermedium befüllt. Wir setzten pro Kryoröhrchen eine Zellzahl zwischen 3×10^6 und 5×10^7 ein. Die gewaschene Zellsuspension wurde nach Dekantieren auf dieselbe Menge aufgefüllt wie Einfriermedium im Kryoröhrchen vorhanden war, d.h. zumeist 500 µl, und anschließend ins Kryoröhrchen überführt. Danach wurden die Kryoröhrchen invertiert und in einem mit Tüchern umwickelten Styroporstander in den -80°C-Gefrierschrank gestellt, um eine langsame Temperatursenkung zu erreichen. Um Zellen wieder aufzutauen, musste beachtet werden, dass bei zu langsamem Auftauen ein hoher Zellverlust durch das bei RT zytotoxisch wirkende Einfriermedium einerseits stattfindet, die Zellen bei zu schnellem Auftauen und Verdünnen jedoch andererseits aufgrund osmotischer Prozesse

lysiert werden können⁶². Um den Zellverlust durch Auftauen möglichst gering zu halten, wurden die Kryoröhrchen nur solange bei 37°C ins Wasserbad gehalten, bis erste Teile des Inhalts gerade zu schmelzen begannen. Dann wurde sofort Auftaumedium aufgetropft und die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Tube überführt. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal wiederholt, bis sich alle Zellen im Falcon-Röhrchen befanden. Dieses wurde auf 14 ml mit Auftaumedium aufgefüllt und für 5 Minuten bei 450 G und RT abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, die Zellen in 3,5 ml Auftaumedium resuspendiert und in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 450 G und RT und eine Wiederholung dieser Waschung in 3,5 ml Auftaumedium. Danach wurden die Zellen noch zwei weitere Male in je 3 ml PBSA gewaschen und mit jeweils demselben Programm zentrifugiert. Nach Dekantieren verblieben ca. 80-100 µl Rest, der auf 1000 µl mit PBSA aufgefüllt wurde. Davon wurden nach Resuspension 10 µl entnommen und mit derselben Menge Trypanblau in eine Neubauerkammer transferiert, um die Zellzahl und den Anteil lebender Zellen zu bestimmen. Sofern dieser Anteil $\geq 80\%$ betrug, konnten die Zellen für eine anschließende Färbung verwendet werden⁶².

3.2.5 Lebend/Tot-Differenzierung mittels Fluorochromen

Als eine weitere Methode, die gemessenen Blasten oder gesunden Zellen näher klassifizieren zu können, führten wir auch verschiedene Experimente zur Lebend/Tot-Differenzierung der gemessenen Zellen durch. Als Untersuchungsmaterial diente uns hierfür peripheres Spenderblut, welches wir sowohl frisch als auch nach Lagerung im Kühlschrank und RT für Stunden bis Tage oder Inkubation bei 56°C im Wasserbad, um den Anteil toter Zellen zu erhöhen, verarbeiteten. Die Lebend/Tot-Assays testeten wir mit Verdünnungsreihen der einzelnen Fluorochrome im Bereich bis 1:1000. Die sonst typischerweise mit Antikörpern konjugierten Fluorochrome wurden für diese Experimente nativ, d.h. als reine Farbstoffe, bzw. in inaktiviertem Zustand (durch vorherige Reaktion mit NH₂-Gruppen haltigen Pufferlösungen) verwendet. Hierfür testeten wir Ansätze mit Trisaminomethanpufferlösung und Diammoniumacetatlösung, die

wir mit AF405 und AF350 inkubierten (sogenannte amino reactive dyes). Wir untersuchten die Reagenzien auf ihre Eignung, die Testzellen nach ihrer Vitalität differenzieren zu können durch Analyse im LSR II Durchflusszytometer. Hierbei kommt es bei toten Zellen zur kovalenten Bindung der Fluorochrome an freie Aminogruppen auf der Zelloberfläche und - bedingt durch die nicht mehr intakte Zellmembran - auch an intrazelluläre Substratgruppen. Bei vitalen Zellen binden weniger Fluorochrom-Moleküle an die Zellsubstrate und werden bei den auf die Inkubation folgenden Waschschritten zu großen Teilen wieder entfernt, sodass gesunde Zellen sich erwartungsgemäß im entsprechenden Kanal negativ, tote Zellen im entsprechenden Kanal positiv darstellten.

Wir testeten in Anlehnung an ein Protokoll von Perfetto et al.⁸⁵ die Lebend/Tot-Assays für die Fluorochrome Propidium Iodid (PI), Pacific Blue (PB), Hoechst™ 33342, Vybrant® DyeCycle™, AlexaFluor 405 (nativ und inaktiviert) und AlexaFluor 350 in jeweils unterschiedlichen Verdünnungen und Träger- bzw. Waschlösungen sowie auch mit verschiedenen Filtern und Spiegeln im LSR II Durchflusszytometer.

3.3 Messtechnik

3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), ist eine Methode, die es ermöglicht Zellen oder andere Partikel wie Bakterien in relativ schneller Zeit auf bestimmte morphologische, aber auch funktionelle Merkmale zu überprüfen und zu quantifizieren. Zur Analyse werden in einer Suspension gelöste Zellen durch Überdruck in eine Nadel gepumpt und im Innern des Geräts mit einer Trägerlösung verdünnt. Diese Beimischung von Trägerlösung (FACSFlow™) ermöglicht es, dass die Zellen einzeln in einem Strahl zur Messkammer (flow cell) gelangen, wo sie durch mehrere hintereinander geschaltete Laser analysiert werden: Die Zellen werden während ihrer Passage durch den Laserstrahl mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren bzw. streuen dieses Licht sowohl in ungefärbtem Zustand als auch im Falle von gebundenen Antikörpern wieder in einer spezifischen Wellenlänge

bzw. Richtung. Diese Lichtemission kann als sogenanntes Streulichtsignal bzw. Fluoreszenzlichtsignal durch Filtereinheiten geleitet und an nachgeschalteten Lichtdetektoren gemessen werden.

Die Registrierung des Streulichts erfolgt im sogenannten Forward- und Side-Scatter, dabei kann im FSC auf die grobe Zellgröße, im SSC auf die Granularität von Zellen geschlossen werden. Lediglich die geänderte Lichtrichtung, nicht aber eine veränderte Wellenlänge des Lichts ist hierbei der gemessene Parameter. Die Registrierung des emittierten Fluoreszenzlichts erfolgt an mehreren Detektoren für unterschiedliche Wellenlängenbereiche je nach Konfiguration des Durchflusszytometers. Die für die Durchflusszytometrie eingesetzten Fluorochrome absorbieren Lichtenergie über einen für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, dem sogenannten Absorptionsspektrum. Bei diesem Vorgang werden Elektronen in eine höhere Energieebene transferiert und emittieren beim Rücksprung in ihr Ausgangsenergieniveau Photonen, was man als Fluoreszenz bezeichnet. Das abgegebene Licht ist dabei stets langwelliger als das eingestrahelte Licht, da zur Anregung der Elektronen mehr Energie nötig ist, als bei der Emission von Photonen wieder frei wird. Der Wellenlängenbereich des emittierten Lichts wird dabei als Emissionsspektrum bezeichnet.

Bei der Signalverarbeitung an den Detektoren des Systems wird die Amplitude des einfallenden Signals in elektrischen Strom umgewandelt und einem Kanal zugeordnet; dieser Vorgang erfolgte beim FACSCalibur analog, beim moderneren LSR II in digitaler Form. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen für eingesetzte Antikörper, d.h. je mehr Bindungsstellen mit einem Farbstoff-konjugierten Antikörper besetzt sind, desto stärker ist das Signal einer Zelle im entsprechenden Kanal. Die gemessenen Signale können linear oder logarithmisch verstärkt werden, üblicherweise geschieht dies linear für die Verstärkung von FSC und SSC und logarithmisch für die Fluoreszenzsignale.

Aus dem registrierten Lichteinfall können also neben Zelleigenschaften wie Größe (FSC) und Granularität (SSC) auch die Quantität oder Intensität gebundener Oberflächenantikörper oder intrazellulär gebundener Antikörper bestimmt werden (Fluoreszenzlichtsignal). Je nach Ausstattung des Geräts kann durch

den Einbau zusätzlicher Laser, Lichtfilter und Detektoren eine Erweiterung der gleichzeitig messbaren und insgesamt möglichen Messparameter erfolgen. Über eine angeschlossene Datenauswertungseinheit in Form eines PCs (LSR II) oder Macintoshs (FACSCalibur) werden die Ergebnisse elektronisch ausgegeben. Zur Datenauswertung besteht die Möglichkeit der Anzeige als Histogramm, der sogenannten Einparameterdarstellung. Hierbei werden horizontal die Kanäle, vertikal die für jeden Kanal gemessene Anzahl an Zellen aufgetragen. Um Zellen jedoch auch für wissenschaftlich anspruchsvollere Zwecke auswerten zu können, besteht neben der Datenausgabe als Histogramm die Möglichkeit, zwei oder drei Parameter gegeneinander als „Dot Plot“ bzw. 3D-„Dot Plot“ darzustellen. In dieser Form ausgegeben können Zellen durch Definieren bestimmter Bereiche im Dot Plot in weitere Analysen ein- oder ausgeschlossen werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Gating. Ein bei jeder Messung auftretendes Problem stellt die Autofluoreszenz von Zellen dar. Um zu definieren, ab welcher Signalstärke (Kanal) eine Zelle für eine Eigenschaft positiv oder gerade noch negativ ist, sind daher Messungen von Kontrollen, d.h. eine Messung ungefärbter Zellen mit Kontrollantikörpern notwendig. Um die Verteilung der Zellen innerhalb einer distinkten Population präzisieren zu können, gibt es über die Darstellung als Dot Plot hinausgehend die Möglichkeit, Zellen als „Contour Plot“ auszugeben. Wird diese Form gewählt, so werden Bereiche im Dot Plot, in denen dieselbe Anzahl Zellen gemessen wurden, durch eine Linie miteinander verbunden. Das Ergebnis ähnelt der topographischen Darstellung von Höhenlinien auf Landkarten und gibt die Heterogenität der Verteilung der Zellen detaillierter wieder. Wir setzen Contour Plots standardmäßig bei der Neuentwicklung der Gating-Strategien am LSR II ein.

Mittels Durchflusszytometrie können also gleichzeitig mehrere Eigenschaften von Zellen sehr schnell und insbesondere auf der Ebene einzelner Zellen erfasst und quantifiziert werden. Klinische Analysen werden so in kürzerer Zeit möglich und spezielle Fragestellungen können individuell untersucht werden.

3.3.2 Konfiguration und Ausstattung der Messgeräte

Die in unserem Labor eingesetzten Durchflusszytometer BD FACSCalibur und BD LSR II wurden im Verlauf der Entstehung dieser Arbeit mit unterschiedlichen Komponenten auf- und umgerüstet, dies bedeutet beispielsweise Umstellung oder Einbau neuer Detektoren, Spiegel, Filter oder Laser. Für die abschließend durchgeführten Messungen und Experimente waren die Durchflusszytometer wie nachfolgend beschrieben konfiguriert.

3.3.2.1 Konfiguration des FACSCalibur Durchflusszytometers

In seiner serienmäßigen Ausstattung verfügt das FACSCalibur über einen 488 nm Laser, mit dem die gleichzeitige Messung der drei Farben FITC, PE und PerCP ermöglicht wird. Das von uns verwendete Gerät war darüberhinaus mit einem weiteren Laser (635 nm) ausgestattet, welcher die Messungen um eine weitere Farbe (APC) erweiterte. Die folgenden Abbildungen illustrieren die dem jeweiligen Laser zugeordneten Anregungs- und Emissionsspektren, sowie die eingebauten Filter für die 4-Farben Messung.

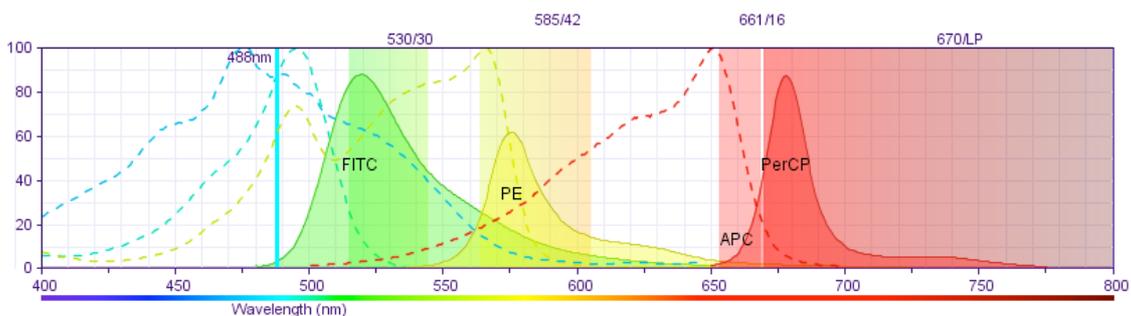


Abb. 3.1: Übersicht der Anregungs- und Emissionsspektren des 488 nm Lasers im FACSCalibur
Dargestellt sind nach oben die max. Signalstärke [%], nach rechts die Wellenlänge [nm]. Wellenlänge des Lasers 488 nm (vertikale Linie), Anregungsspektrum jeweils gestrichelt, Emissionsspektrum jeweils flächig. APC wird von diesem Laser nicht angeregt.

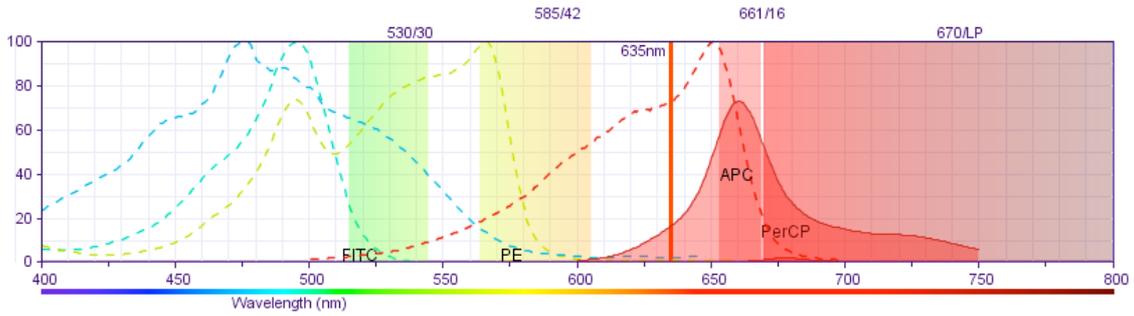


Abb. 3.2: Übersicht der Anregungs- und Emissionsspektren des 635 nm Lasers im FACSCalibur
 Dargestellt sind nach oben die max. Signalstärke [%], nach rechts die Wellenlänge [nm]. Wellenlänge des Lasers 635 nm (vertikale Linie), Anregungsspektrum jeweils gestrichelt, Emissionsspektrum jeweils flächig. APC wird von diesem Laser angeregt, FITC, PE, PerCP nicht.

3.3.2.2 Konfiguration des LSR II Durchflusszytometers

Das bei uns eingesetzte LSR II Durchflusszytometer verfügt in seiner zuletzt eingestellten Konfiguration über insgesamt vier Laser: 405 nm (violet), 488 nm (blue) und 633 nm (red). Zusätzlich zu dieser serienmäßigen Ausstattung mit drei Lasern wurde ein 325 nm UV Laser eingebaut, der u.a. die gleichzeitige Messung von Hoechst Red/Blue oder AlexaFluor 350 ermöglichte, zwei Farbstoffe, die wir mitunter für unsere Lebend/Tot-Differenzierungsexperimente einsetzen. Die folgenden Abbildungen geben einen vollständigen Überblick über die verwendeten Detektoren, Spiegel und Filter für jeden der vier Laser.

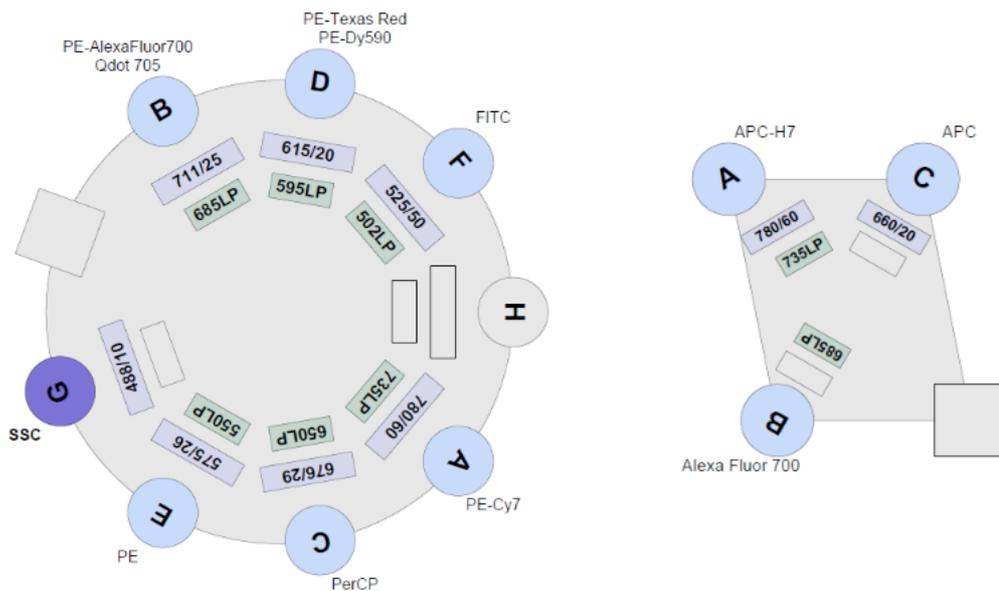


Abb. 3.3: Konfiguration des blauen (488nm, links) und roten (633nm, rechts) Lasers am LSR II

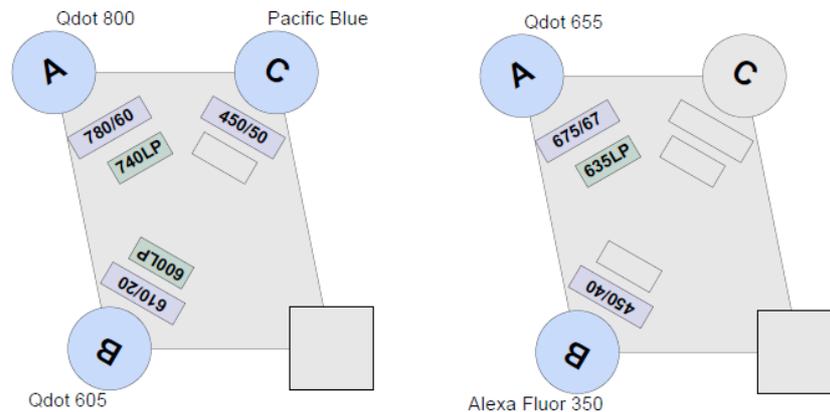


Abb. 3.4: Konfiguration des violetten (405nm, links) und UV (325nm, rechts) Lasers am LSR II

3.3.3 Kalibrierung und Kompensation der Messgeräte

Zur ständigen Qualitätskontrolle und Erhaltung der Reliabilität unserer gemessenen Daten war es notwendig, in regelmäßigen Abständen eine Kalibrierung und Kompensation unserer Instrumente durchzuführen. Diese Kalibrierung erfolgte an beiden Geräten wöchentlich mithilfe von CaliBRITE™-Beads (FACSCalibur) bzw. CST-Beads™ (LSR II). Diese sogenannten Beads sind Mikropartikel einer bestimmten Größe und Morphologie, die ungefärbt oder an verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind. Mit der Messung dieser Beads an den Durchflusszytometern konnte erfasst werden in welchem Ausmaß das von den einzelnen Farbstoffen emittierte Licht in die einzelnen Detektoren des Geräts einstrahlte und sich dort mit dem Spektrum des emittierten Lichts eines anderen Fluorochroms vermengte bzw. überschneidet. Um genaue Ergebnisse erhalten zu können, wurden in einem weiteren Schritt diese Überschneidungen der Fluoreszenzen gegeneinander abgeglichen und für die einzelnen Kanäle durch gegenseitige Kompensation benachbarter Kanäle korrigiert.

3.3.3.1 Kalibrierung und Kompensation am FACSCalibur Durchflusszytometer

Die Kalibrierung des FACSCalibur Durchflusszytometers wurde nach einer Spülung des Geräts mit FACSClean (Hypochlorid), FACSRinse (seifige Lösung) und entsalztem Wasser für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Um von einer konstanten Messgenauigkeit der Laser ausgehen zu können, stellten wir sicher,

dass das Gerät vor Beginn der Kalibrierung bereits min. 30 Minuten in Betrieb war und somit die eingebauten Laser ihre Betriebstemperatur erreicht hatten. Wir bereiteten zwei FACS-Röhrchen A und B vor und pipettierten in Tube A 75 µl PBS, 5 µl unlabeled beads und 5 µl APC Beads. In Röhrchen B gaben wir 125 µl PBS, 5 µl unlabeled beads und jeweils 5 µl der FITC-, PE-, PerCP- und APC konjugierten Beads. Zur Durchführung der Kalibrierung verwendeten wir die Funktion Lyse/Wash des Programms FACSCComp mit den Einstellungen Threshold 52 und Gain 2,00. Nach Eingabe der Lot IDs unserer Beads folgten wir den Anweisungen des Kalibrierungsprogrammes und wiederholten den Test, falls dies nötig war, mit einer höheren Konzentration an Beads in entsprechend mehr PBS. Nach erfolgreichem Testlauf wurden die Ergebnisse übernommen und zur internen Kontrolle chronologisch in eine Excel-Tabelle eingetragen. Während der gesamten Zeit unserer Messungen ergaben sich hierbei nur geringe Schwankungen für die einzelnen Parameter. Nach erfolgter wöchentlicher Kalibrierung führten wir alle vier Wochen eine manuelle Anpassung der gemessenen Parameter zur Kompensation der sich im Emissionsspektrum überlappenden Kanäle durch.

3.3.3.2 Kalibrierung und Kompensation am LSR II Durchflusszytometer

Die Kalibrierung an unserem zweiten Durchflusszytometer erfolgte analog zu der zuvor beschriebenen Kalibrierung am FACSCalibur. Statt der CaliBRITE™-Beads verwendeten wir an diesem Gerät jedoch die hierfür vorgesehenen Cytometer Setup & Tracking-Beads. Die Kalibrierung wurde gemäß den Anweisungen des Kalibrierungstools CST-Setup innerhalb der BD FACSDiva-Software durchgeführt. Die Kompensation der bei diesem Gerät deutlich größeren Anzahl an Kanälen erfolgte automatisiert durch die Software. Zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit wurden in die Kompensation 14 Farben durch Färbung von MNCs aus peripherem Spenderblut und angefärbte Beads eingeschlossen. Die Einzelfärbungen erfolgten jeweils mit Antikörpern gegen humanes CD3, für Tandemfarbstoffe wie PE-Dye590 oder PE-Cy7 setzten wir dagegen diejenigen Antikörper ein, die für die weiteren Messungen in diesem Kanal vorgesehen waren und verwendeten wegen der Seltenheit dieser Zellen im pe-

riperen Blut Knochenmark aus frischen oder eingefrorenen Patientenproben als Material. Nach abgeschlossener Kalibrierung und Kompensation wurden die neuen Einstellungen für die weiteren Messungen übernommen und sofern bei den Messungen genug Zellen vorhanden waren bisweilen mit den zuvor gültigen Settings verglichen.

3.3.4 Messung der Patientenproben

3.3.4.1 Planung und Messung von Erstdiagnosen

Da es bei der Planung der Markerkombinationen (Panels) für die Messung einer Erstdiagnose neben der Frage, für welche Marker der Patient positiv oder negativ ist, auch darum ging, die geeignete Kombination für spätere MRD-Messungen (Follow-Up) festzulegen, mussten die Panels möglichst viele Marker umfassen, um diese Frage auch für möglichst viele Marker beantworten zu können. Begrenzt durch die maximal verfügbare Anzahl an KM-MNC und maximale Auswahl vorrätiger Antikörper führten wir die Messungen von B-ALL Erstdiagnosen in 2 Runden durch: In der 1. Färbung testeten wir verschiedene FITC- oder PE-konjugierte Marker lediglich auf ihre Positivität bzw. Negativität. Sofern diese schließlich in einer ersten Auswertung für die Erkennung leukämischer Blasten und ggf. auch für das weitere MRD-Monitoring relevant waren, testeten wir diese Marker in einer 2. Färbung mit Negativkontrollen und in Kombination mit dem sogenannten Backbone (10-PE/34-PerCP/19-APC für FITC-konjugierte Marker, 10-FITC/34-PerCP/19-APC für PE-konjugierte Marker), um sie von gesunden bzw. regenerierenden Zellen differenzieren zu können. Außerdem ging in die Festlegung der Panels für Erstdiagnosen die jeweilige Diagnose mit ein, da sich die Marker je nach Leukämie-Subtyp stark unterscheiden. Um die Diagnose vor der aufwändigen ED-Messung herauszufinden, etablierten wir einen Schnelltest mit 4 Testansätzen bzw. schlossen die Ergebnisse des Leukämie-FACS des KMT-Routinelabors der Kinderklinik, das für alle Erstdiagnosen zur Leukämieklassifizierung angefertigt wird, in unsere Überlegungen mit ein. Für den Schnelltest zur Einordnung der Leukämie in die myeloische (AML)

bzw. lymphatische (B/T-ALL) Reihe färbten wir folgende Kombinationen mit für die jeweilige Leukämie typischen Markern:

1. CD33-FITC / CD10-PE / HLA-DR-PerCP / CD19-APC
2. CD34-FITC / CD5-PE / CD3-PerCP / CD19+CD33+HLA-DR-APC
3. CD33-FITC / CD13-PE / CD4-PerCP / CD11b-APC
4. CD2-FITC / CD56-PE / CD34-PerCP / CD117-APC

Teströhrchen 1 testete dabei auf eine B-ALL, Teströhrchen 2 auf eine T-ALL und Teströhrchen 3 und 4 auf eine AML.

Nach dem Ergebnis des Schnelltests und den zusätzlichen Informationen über weitere Marker aus dem KMT-Routinelabor etablierten wir für Erstdiagnosen die im Anhang abgebildeten Messpanels (siehe Abb. 8.2 und Abb. 8.3), wobei wir pro Test-Tube $0,2 \times 10^6$ (B-ALL) bzw. $0,3 \times 10^6$ (T-ALL) Zellen einsetzten. Mit den in diesem Panel enthaltenen Markerkombinationen konnten wir nach Auswertung der Daten meist mehrere geeignete Marker für das spätere Follow-Up, d.h. der Messung der minimalen Resterkrankung identifizieren.

Für AML-Erstdiagnosen gab es keine ähnlich einheitlichen Vorgaben von Test-Panels wie für die B/T-ALL. Hierbei waren die Ergebnisse der vom KMT-Routinelabor untersuchten Marker entscheidend, darüber hinaus untersuchten wir die Expression der häufigsten myeloischen Marker. Aufgrund der Vielzahl der nötigen Färbungen wurden AML-Proben nur experimentell am LSR II gemessen, auch die Messungen von Erstdiagnosen und Follow-Up-Proben von T-ALLs erfolgten ausschließlich am LSR II. Die Messung dieser Proben am LSR II erfolgten hauptsächlich zu Testzwecken, während sich die eigentliche Etablierung der MRD später auf die B-ALL beschränkte. Die Färbung und Messung der Zellen erfolgte am Punktionsstag, gemessen wurden die Proben von o.g. Ausnahmen abgesehen an beiden Durchflusszytometern. Um zu entscheiden, wieviele Zellen pro Teströhrchen gemessen werden sollten, damit eine Aussage über die individuelle Eignung als MRD Marker getroffen werden konnte, bezogen wir das Ergebnis des Knochenmarkausstrichs des hämatologischen Routinelabors mit ein. Lag der dort manuell ausgezählte Anteil an Blasten über 90%,

wie es zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufig der Fall war, so genügten am FACSCalibur 20.000 gemessene Zellen. Aufgrund der größeren Anzahl gesunder Vergleichsproben an diesem Gerät wurden die Proben hier mit erster Priorität gemessen, anschließend erfolgte die Messung von 30.000 Zellen bzw. den restlichen vorhandenen Zellen am LSR II. Zur Messung der Daten wurden die jeweils aktuellsten Settings benutzt (s. Kapitel 3.3.3 Kalibrierung und Kompensation der Messgeräte). Pro Teströhrchen setzten wir $0,2 \times 10^6$ Zellen ein. Verbleibendes Material wurde für weitere Experimente im Rahmen eines anderen Zweigs der Forschungsarbeiten in unserer AG (z.B. Nachweis leukämischer Stammzellen, Kologenizität, Transfer auf ein Mausmodell) verwendet und teilweise für spätere Untersuchungen wie z.B. Nachfärbungen kryokonserviert.

3.3.4.2 Planung und Messung von MRD-Analysen

MRD-Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten (z.B. Tag 15/33/100) im Behandlungsprotokoll ALL-BFM 2000 (sogenannte Therapieoptimierungsstudie), nach welchem in der Universitätskinderklinik Tübingen akute Leukämien behandelt werden, im Rahmen einer Knochenmarkpunktion entnommen. Von den meisten Patienten, von denen wir eine sogenannte MRD-Probe erhielten, war bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Knochenmark untersucht worden oder eingefrorenes Material aus der Routine nachgefärbt worden, sodass wir zur Planung der Panels auf die Ergebnisse der Erstdiagnose bzw. früherer MRD-Messungen zurückgreifen konnten. Neben den geplanten Zeitpunkten der Punktionen im Therapieverlauf erreichten uns jedoch auch MRD-Proben zu unvorhersehbaren Zeitpunkten, z.B. wenn sich der Verlauf einer Erkrankung verschlechterte oder Verdacht auf ein akutes Rezidiv bestand. Mit den zum Zeitpunkt der Diagnose festgelegten Markern für das Follow-Up und den Ergebnissen voriger MRD-Messungen des Patienten legten wir individuell unterschiedliche Testpanels fest, zumeist bedeutete dies zwischen vier und sieben Teströhrchen. Zur Ansicht einer solchen Untersuchung sei aufgrund der großen Variabilität der MRD-Panels beispielhaft auf Abb. 8.1: Beispielplanung einer MRD-Messung an beiden Durchflusszytometern, verwiesen. Auch die Messung der MRD-Proben führten wir auf beiden Durchflusszytometern durch. Ein Problem

bestand hierbei in der oft geringen Zellzahl der KMP-Probe im Krankheitsverlauf. Die durch Chemotherapie verursachte Panzytopenie im Knochenmark der Kinder limitierte insbesondere bei guten Therapie-Respondern die mögliche Zahl der Färbungen. Daher setzen wir oftmals nur die Hälfte der sonst üblichen 1×10^6 Zellen pro Testtube ein, um möglichst viele Marker nachverfolgen zu können und die Durchführung der Messung an beiden Geräten zu ermöglichen.

3.3.4.3 Planung und Messung von Templates

Um bei unseren Messungen auffällige Zellen eindeutig leukämischen Blasten oder Zellen gesunden bzw. regenerierenden Knochenmarks zuzuordnen zu können, waren möglichst viele sogenannter Template-Proben notwendig. Die Template-Proben mussten ähnlich den Messungen bei Erstdiagnosen für möglichst viele Marker durchgeführt werden, um für möglichst viele Marker bei späteren Proben die obenstehende Zuordnung verbessern zu können. Darüber hinaus waren für beide Geräte separate Messungen von Template-Proben nötig, da es sich um zwei grundsätzlich verschiedene Messgeräte handelt, betrachtet man beispielsweise die unterschiedliche Konfiguration (Laser/Detektoren) oder Messtechnik (digital/analog) der Geräte. Bei ausreichend viel Material setzten wir für Templates je 1×10^6 Zellen für meist 21 zu untersuchende Marker ein. Die dafür nötigen Messplanungen werden ebenfalls im Anhang dieser Arbeit veranschaulicht (siehe Abb. 8.4 und Abb. 8.5).

3.4 Datenauswertung

Da hinter unseren Messungen oft klinisch relevante Fragestellungen standen, war die Auswertung der Daten in vielen Fällen innerhalb kurzer Zeit gefordert. Hieraus ergaben sich bisweilen verschiedene Probleme, insbesondere bei hohem Probenaufkommen war es nicht immer möglich, die je nach Patient individuell unterschiedlich aufwändigen Auswertungen zeitnah durchzuführen, weshalb je nach klinischer Situation der Patienten Prioritäten gesetzt werden mussten. Daneben stellte sich heraus, dass einzelne Marker je nach ihrer Expression bzw. Intensität bei Erstdiagnosestellung in unterschiedlicher Frequenz bei den

Patienten untersucht wurden, so war beispielsweise die Überexpression von CD58 auf Leukozyten sehr häufig Bestandteil der definierten Follow-Up-Proben und dementsprechend besser untersucht als beispielsweise die sehr viel seltenere Expression von intrazellulärer TdT bei B-ALLs.

Da es bei Messungen der minimalen Resterkrankung um den Nachweis kleinster Populationen von bis zu 10 Zellen geht, galt es, ganz besonders eine optimale Kompensation der gemessenen Kanäle zu etablieren und den Anteil falsch positiver Zellen sowie das sogenannte „carry over“ von einem Teströhrchen zum nachfolgenden zu minimieren. Wir gingen diese Probleme durch regelmäßige Kalibrierung, Kompensation und Wartung der Messgeräte sowie durch gründliches Spülen vor und nach unseren Messungen, Abwischen der Nadel mit speziellen Tüchern und Zwischenspülen mit Aqua dest. oder PBS zwischen den einzelnen Tests an. Darüberhinaus zählten zur Vermeidung und Reduzierung systematischer Fehler regelmäßige Qualitätskontrollen anhand von Spenderblutzellen in unterschiedlichen Konzentrationen, Antikörpertitrationen, der Vergleich unserer Ergebnisse mit Vorbefunden sowie Backups zur Sicherung der Messdaten. Wir führten die Messungen zu Beginn dieser Arbeit ausschließlich am FACSCalibur durch und arbeiteten sukzessive an der Übertragung der Methode auf das LSR II-Cytometer, indem die Proben zunehmend an beiden Geräten gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen wurden.

3.4.1 Auswertung der FACSCalibur Daten

Zur Auswertung unserer Messdaten stand uns ein Macintosh-Rechner mit der CellQuest 3.3-Software zur Verfügung. Für die individuellen Marker entwickelten wir jeweils Auswertungsmasken, in denen sukzessive die Regionen der untersuchten gesunden bzw. regenerativen Templateproben definiert und weiterentwickelt wurden. Die Auswertung selbst erfolgte für die Patienten individuell mit den Auswertungsmasken der zuvor als Follow-Up gefärbten Marker. Dazu wurde für jeden neuen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein Panel der am häufigsten gefundenen Markern gefärbt (vgl. 3.3.4.1: Planung und Messung von Erstdiagnosen). Die Ergebnisse dieser 1. Messung, bei der die

meisten Marker einzeln untersucht wurden, fügten wir in eine erste Auswertungsmaske ein, um einen schnellen Überblick über die zu erwartenden positiven und negativen Marker zu gewinnen. Um die Grenze der negativen zu den positiven Zellen für die einzelnen Marker festzulegen und um daraufhin die Färbungen für die zweite Runde festzulegen, war auch die Messung der jeweiligen Isotypkontrollen (Mouse IgG1, Mouse IgG2b, Mouse IgM) notwendig. Diese zweiten Färbungen erfolgten dann nicht nur mit dem entsprechenden Marker, sondern in Kombination mit dem sogenannten Backbone, d.h. zumeist CD10, CD34 und CD19, um die auffälligen Zellen näher einordnen zu können. Da der Blastenanteil im KM-Ausstrich der Patienten mit Erstdiagnose meist im Bereich zwischen 90 - 100 % lag, waren 20.000 gemessene Zellen pro Teströhrchen bei eingesetzten 200.000 Zellen in den meisten Fällen ausreichend, um die Blastenpopulation in der Auswertung identifizieren zu können.

3.4.1.1 Auswertung von Erstdiagnosen

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis einer dieser ersten Analysen für eine 5-jährige Patientin mit Erstdiagnose einer c-ALL. Für die zweite Färbung festgelegt wurden CD13/CD10/CD34/CD19 (3-Farben-Backbone) und CD21/CD10/CD34/CD19 (3-Farben-Backbone) aufgrund ihrer jeweils über die Isotypkontrolle (IgG1 für CD13 und CD21) hinaus gemessenen Fluoreszenz. In der Messung der nachgefärbten Röhrchen zeigten sich diese beiden Marker jedoch als nicht relevant für das Follow-Up. Mittels der später hierfür festgelegten Marker CD58, CD45, CD38 und intrazellulärer TdT (jeweils mit 3-Farben-Backbone und zugehörigen Isotypkontrollen) stand bereits eine ausreichende Anzahl an Follow-Up-Markern zur Verfügung, um die Blastenpopulation (morphologisch 97 %) unter den Lymphozyten zu identifizieren.

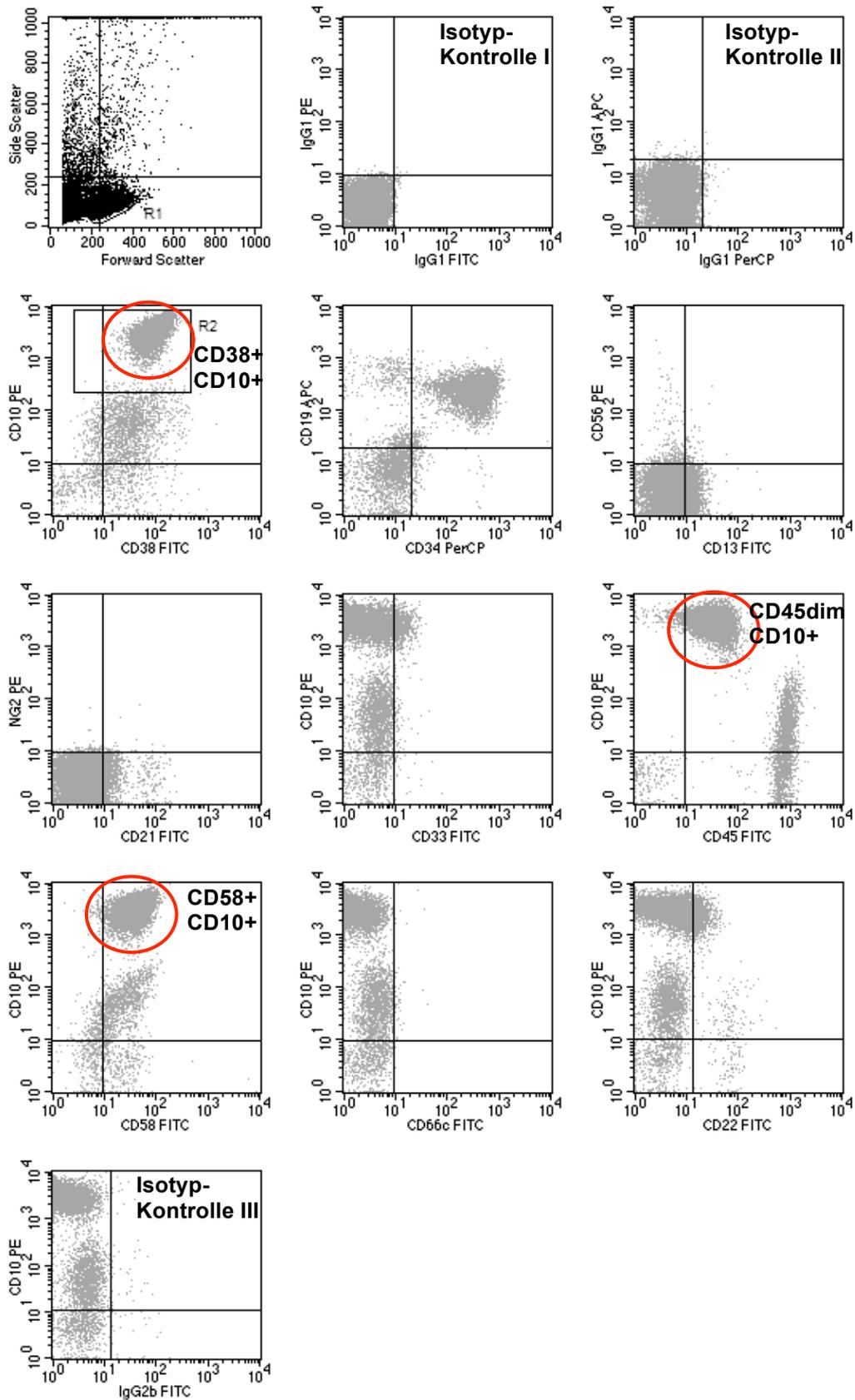


Abb. 3.5: Erste Analyse einer neu diagnostizierten B-ALL

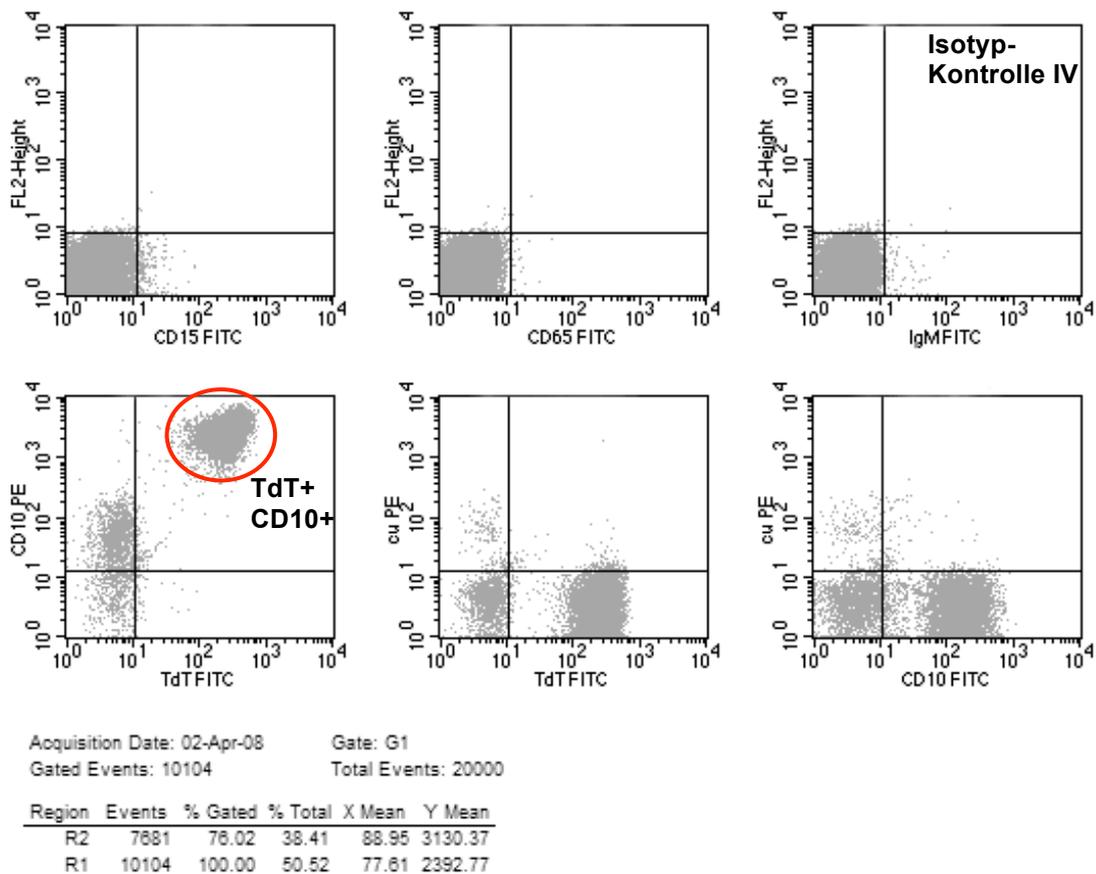


Abb. 3.6: Erste Analyse einer neu diagnostizierten B-ALL (Fortsetzung)

Nach Gating auf Lymphozyten (R1) werden die Zellen auf ihre Expressivität und ggf. Intensität des jeweils in FITC (NG2, cu und CD56 in PE) gefärbten Markers untersucht. Die Quadrantenteilung wird in den Dot Plots der Isotypkontrollen definiert und in die zugehörigen Marker-Dot Plots übertragen. Für das Follow-Up wurden die Marker CD58, CD45, CD38 und TdT festgelegt.

Für CD58 soll exemplarisch die weitere Auswertung für diese Patientin gezeigt werden. Dazu wird im FSC/SSC-Dot Plot zunächst großzügig auf Lymphozyten gated (R1), um diese nachfolgend in die Zellpopulationen CD19⁺/CD34⁺ (R2) und CD19⁺/CD34⁻ (R3) aufzutrennen (s. Abb. 3.7).

Die Zellen in R2 und R3 werden nun getrennt voneinander in weiteren Gates untersucht (s. Abb. 3.8). Für die CD19⁺/CD34⁺-Zellen (R2) erfolgt eine Auftragung von CD58-FITC gegen CD10-PE. Über die deutliche Population von CD10⁺/CD58^{dim}-Zellen wird das Gate R9 gelegt. R4 und R5 bezeichnen Regionen gesunden regenerierenden Knochenmarks (Template-Gates). Zellen, die gleichzeitig im Gate R1, R2 und R9 liegen, werden danach in einem CD34-

PerCP gegen CD19-APC-Dot Plot aufgetragen, um ihre Position in diesen Vorauswahl-Dot Plot zurückzugaten (backgating). Hierbei wird überprüft, ob die fraglichen Blasten aus R9 tatsächlich CD19⁺ sind oder als CD19-negative Zellen in das Gate R2 einstrahlen. Auf die deutlich CD19-positiven Zellen wird nun das Gate R10 gelegt und diese Zellen einmal ohne diese engere Definition durch R10 und einmal mit R10 in zwei FSC/SSC-Dot Plots aufgetragen um dort ihr Erscheinen als Lymphozyten, Monozyten oder Dubletten aufzuzeigen (s. Abb. 3.8). Leukämische Blasten sind bei dieser Erkrankung typischerweise als CD19⁺/CD10⁺/CD34^{+/-}-Zellen zu finden. Gate 10 könnte in dieser Darstellung auch enger auf den Kern des Zellclusters eingestellt werden um so eine genauere Position im FSC/SSC darzustellen.

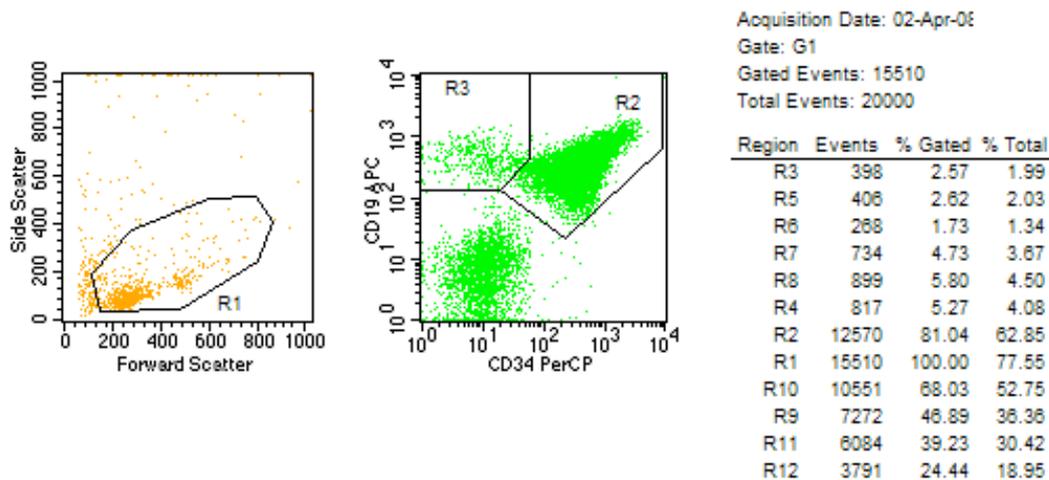


Abb. 3.7: CD58 Auswertung (Erstdiagnose) 1/3

Die in R1 großzügig gegateten Zellen werden in CD19⁺/CD34⁺ (R2) und CD19⁺/CD34⁻ (R3) aufgeteilt.

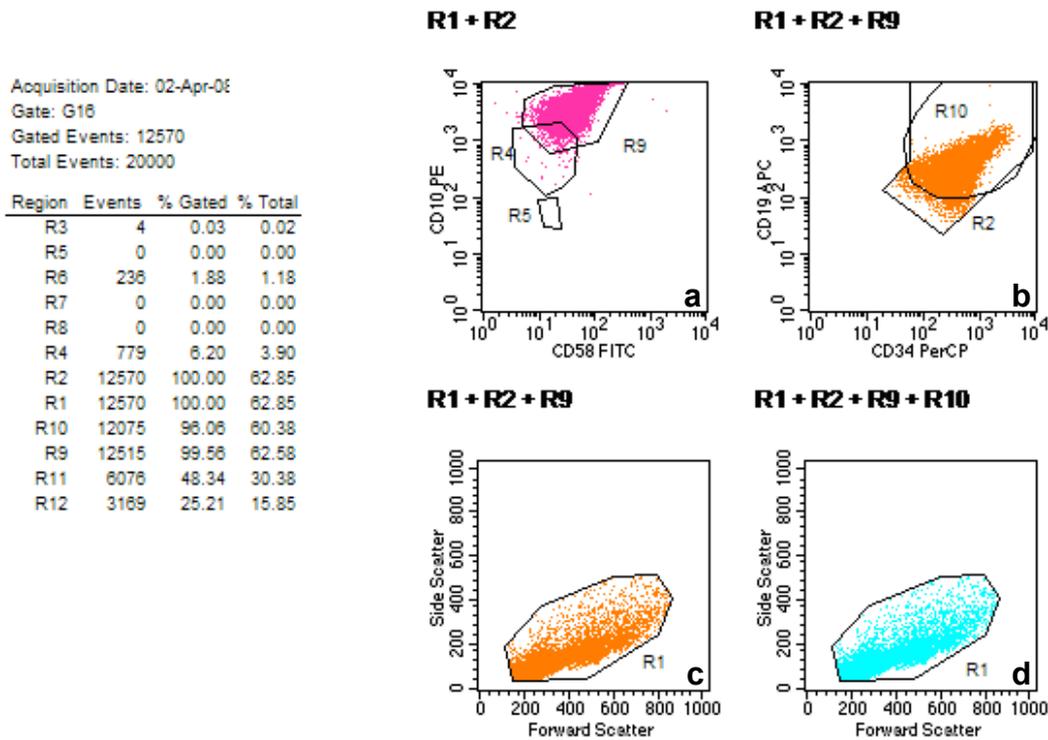


Abb. 3.8: CD58-Auswertung (Erstdiagnose) 2/3

CD19⁺/CD34⁺-Zellen (R2), die gleichzeitig in R1 liegen werden in Abb. (a) gegen CD58-FITC und CD10-PE aufgetragen und durch R9 als potentiell leukämische Blasten markiert. Gates R4 und R5 bezeichnen Regionen physiologischer Zellpopulationen. In Abb. (b) werden die Zellen daraufhin gegen CD34-PerCP und CD19-APC aufgetragen, um mit R10 die CD19⁺-Zellen besser einzugrenzen. Es folgt die Auftragung dieser Zellen in Abb. (d) im FSC/SSC, getrennt davon die Auftragung ohne R10 (c).

Für die CD19⁺/CD34⁺-Zellen (R3) wird dieses Gating analog durchgeführt (s. Abb. 3.9). Regionen physiologischer Zellpopulationen (Templates, siehe Kap. 1.3.1) sind in diesem Teil der Auswertung in R6, R7 und R8 dargestellt. Potentielle leukämische Blasten werden in diesem Fall mit R12 markiert und ihre Position in den CD34-PerCP gegen CD19-APC-Dot Plot und FSC/SSC zurück gegatet. Da die leukämischen Blasten in diesem Fall größtenteils CD34⁺ waren, ergeben sich in diesem Zweig der Auswertung kaum Ergebnisse. Diese Auswertung führten wir für alle anderen gefärbten Marker und ihrer Isotypkontrollen fort und bestimmten so die für den Patient individuell geeigneten Marker für das Follow-Up und damit das Monitoring der minimalen Resterkrankung.

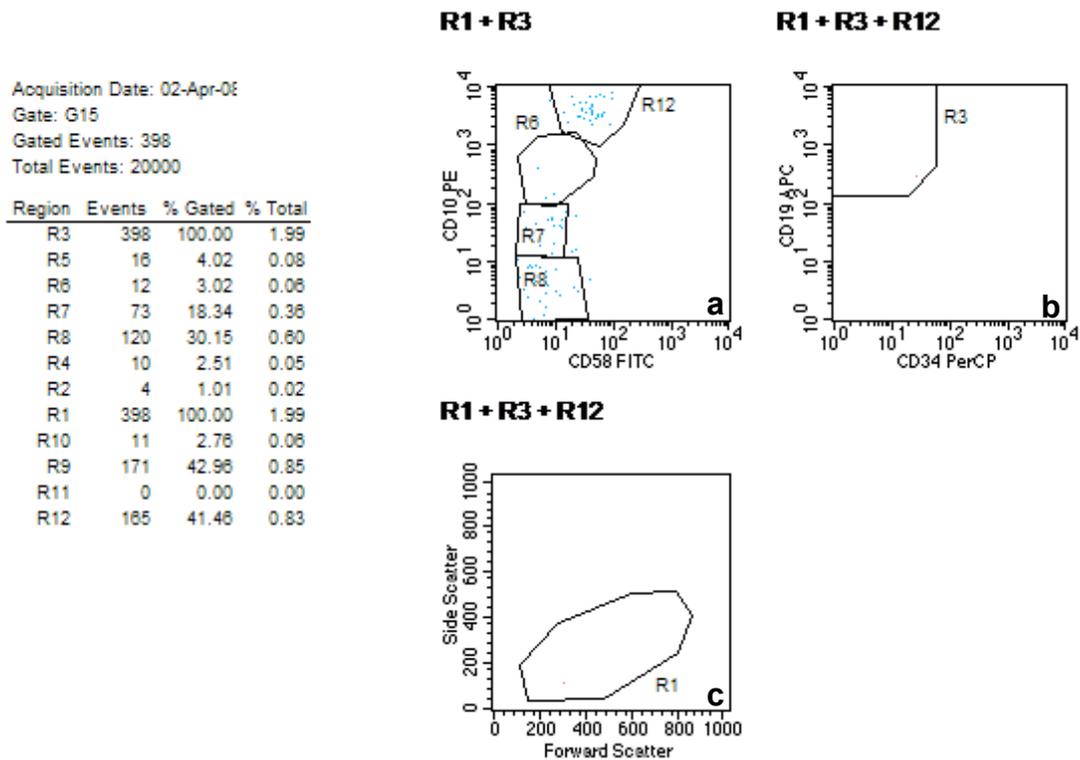


Abb. 3.9: CD58-Auswertung (Erstdiagnose) 3/3

Analog zur vorigen Abbildung werden hier die $CD19^+$ / $CD34^-$ -Zellen aus R3 untersucht. Potentielle Blasten werden in Abb. (a) mit R12 gated und auf ihre Eigenschaft als $CD19^+$ überprüft (b). Physiologische Zellpopulationen liegen in dieser Darstellung in R6, R7 und R8. Anschließend erfolgt Backgating in FSC/SSC (c). Da bei dieser Patientin der Großteil der Blasten $CD34^+$ war sind in diesem Zweig der Auswertung wie erwartet weniger Blasten zu sehen (lediglich ein Dot nach Backgating der Population aus R12).

3.4.1.2 Auswertung der Minimal Residual Disease

Spätere MRD-Proben der Patienten wurden lediglich mit den definierten Markerkombinationen (und Backbone) gefärbt. In dieser Phase waren praktisch alle unserer Patienten mit einer (Poly-)Chemotherapie oder Kortikoiden anbehandelt. Da beide Therapien toxisch auf Leukozyten wirken, war der wichtigste Unterschied in der Auswertung einer MRD-Probe gegenüber einer Auswertung von Erstdiagnosen die stark verringerte Zellzahl, die für unsere Färbungen zur Verfügung stand. Lag die Zellzahl des erhaltenen Materials unterhalb der für die Durchführung der Follow-Up-Färbung notwendigen Zellzahl, so verteilten wir die Zellen nicht zu gleichen Anteilen auf die Teströhrchen, sondern gaben zu der aussagekräftigsten Markerkombination anteilig mehr Zellen hinzu als zu weniger aussagekräftigen Kombinationen. Hierbei war es wichtig, die Antikörper nach dem eingesetzten Volumen und nicht nach der eingesetzten Zellzahl hin-

zuzugeben, wie unter Kap. 3.2 beschrieben. Das nächste Problem neben der aufgrund zytotoxischer Medikamente erniedrigten Zellzahl stellte die Tatsache dar, dass sowohl Erythrozyten, die trotz der Isolierung mononukleärer Zellen bei der Probenverarbeitung nicht entfernt wurden, als auch Zellfragmente, sogenannte „debris“, im Gerät zu der Gesamtzahl gemessener Events mit beitrugen, unser MRD-Ergebnis jedoch ein prozentualer Anteil von Zellen mit aberrantem Immunphänotyp an der Gesamtzahl der Lymphozyten sein sollte. Aus diesem Grund erforderten die Auswertungen der MRD-Proben stets ein Teströhrchen zur Permeabilisation von Zellen und eine Vorauswahl, durch die Zelltrümmer von lebenden Zellen differenziert werden konnten. Das Teströhrchen mit permeabilisierten Zellen war notwendig, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren und um dadurch einen Erythrozyten-Korrekturfaktor berechnen zu können, der bei der endgültigen Auswertung miteingerechnet werden konnte. Die Permeabilisierung der Zellen führten wir für diese Zwecke analog zu der in Kap. 3.2.3 beschriebenen Methode der intrazellulären Färbung mit 8E-Reagenz durch. Gab es im Follow-Up-Panel keinen intrazellulären Marker, der diese Permeabilisation ohnehin notwendig gemacht hätte, so färbten wir zusätzlich zu den Follow-Up-Markern das sogenannte perm19-Röhrchen, hierbei wurden die eingesetzten Zellen extrazellulär mit CD19-APC gefärbt und anschließend permeabilisiert. Aus den Rohdaten dieses permeabilisierten Teströhrchens ergänzten wir so die MRD-Auswertungen um zwei weitere Auswertungsmasken: die Auswertungsmaske für die sogenannten „debris“, um einen Korrekturfaktor für Zelltrümmer und daraus den Anteil lebender Zellen berechnen zu können, und die Auswertungsmaske „perm19“ zur Berechnung des Erythrozyten-Korrekturfaktors und des Anteils CD19-positiver Zellen (bei B-ALLs). Die folgenden Abbildungen illustrieren eine derartige Vorauswertung für einen 6-jährigen Patienten mit B-ALL zum Zeitpunkt einer Messung der minimalen Resterkrankung knapp 4 Monate nach Ersterkrankung.

In der Darstellung der permeabilisierten Zellen im FSC/SSC (s. Abb. 3.10) wurde dazu die linke Begrenzung des Gates R3 vor die erste erkennbare Population gelegt, um den größten Teil debris, die sich im FSC klein darstellen, herauszugaten. Gemessen wurden 10.000 Zellen.

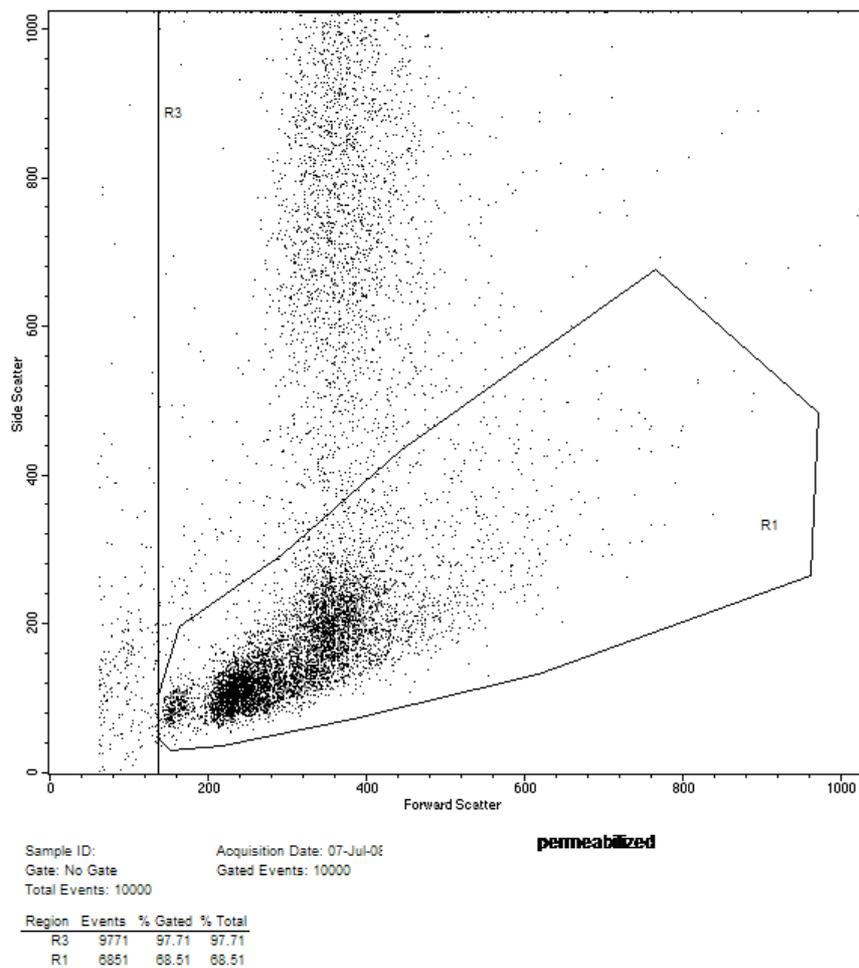


Abb. 3.10: MRD-Auswertung, Bestimmung der debris (Zelltrümmer)

Das Gate R3 wird in seiner linken Begrenzung vor den im FSC ersten Cluster an Zellen gelegt um Zelltrümmer (debris) größtenteils aus dem Gating auszuschließen. R1 liegt dabei großzügig um Lympho- und Monozyten.

Der nächste Schritt der Auswertung war die erneute Darstellung dieser permeabilisierten Zellen in der „perm19“-Auswertungsmaske (s. Abb. 3.11). Hier wurde zunächst großzügig um Leukozyten gegatet (R1) und unter den gegateten Zellen die Region für CD19-positive permeabilisierte Zellen definiert (R2). Der Anteil dieser Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl in diesem Tube ging später in die Berechnung der Korrekturfaktoren mit ein.

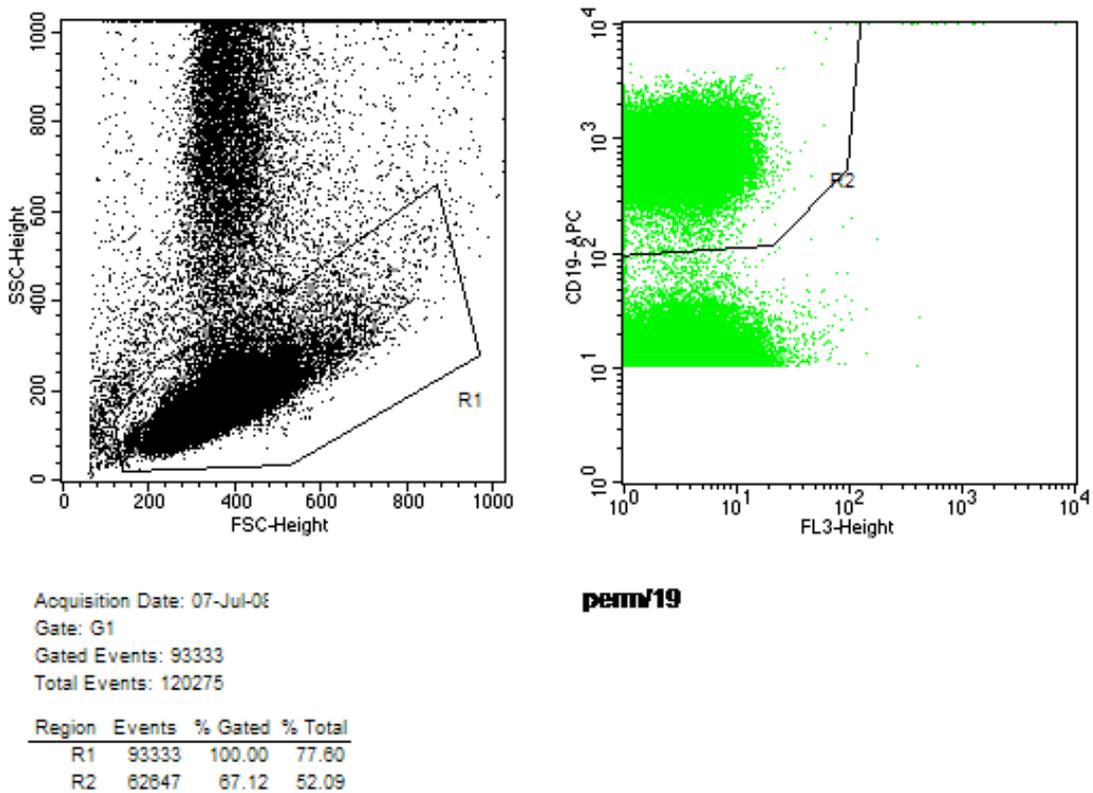


Abb. 3.11: MRD-Auswertung, Gating der CD19⁺-permeabilisierten Zellen (R2) nach großzügigem Gating um Leukozyten (R1).

Die Auswertungsmasken „debris“ und „perm19“ wurden für jede MRD-Auswertung einmal erstellt, um die Korrekturfaktoren für die Berechnung des Anteils an Blasten in den nachfolgend auszuwertenden Einzelfärbungen festzulegen. Für diesen Patient wurden zum Monitoring der MRD insgesamt vier Marker (CD58, CD38, CD45 und CD66c) neben dem perm19-Röhrchen untersucht. Die weitere Auswertung wurde somit für jeden dieser vier Marker einzeln durchgeführt und soll im Folgenden exemplarisch an CD58 (bester Marker des Patienten) gezeigt werden. Dazu mussten die gemessenen Daten in Auswertungsmasken geladen werden, die wir mithilfe der Auswertungsmasken der Erstdiagnose und Template-Proben für die einzelnen Marker erstellten. In einem ersten Schritt wurden die Messdaten im FSC/SSC- und CD34/CD19-Plot aufgetragen (s. Abb. 3.12). Um möglichst viele Zellen in die Analyse miteinzubeziehen, wurde zunächst großzügig auf Lympo- und Monozyten gegatet (R1).

Diese Zellen wurden anschließend in CD19⁺/CD34⁺ (R2) und CD19⁺/CD34⁻ (R3) aufgeteilt.

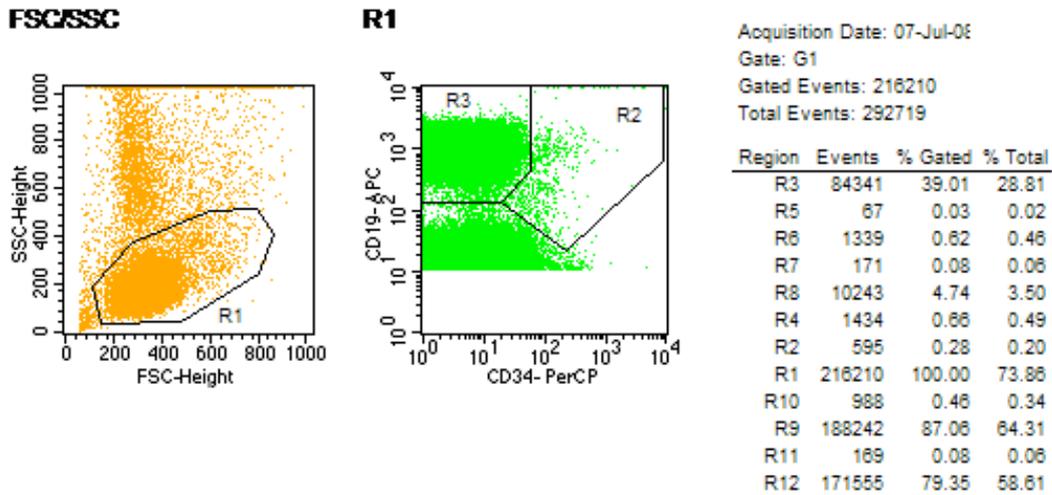


Abb. 3.12: MRD-Auswertung für CD58 1/3

Die in R1 großzügig gegateten Zellen werden in CD19⁺/CD34⁺ (R2) und CD19⁺/CD34⁻ (R3) aufgeteilt.

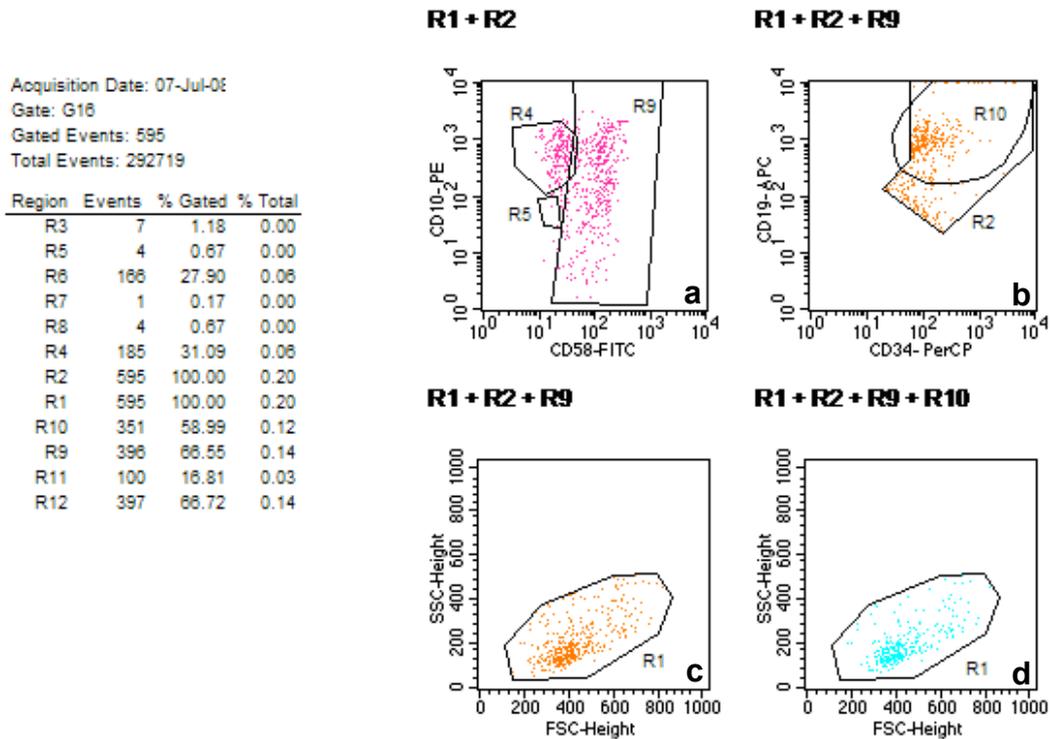


Abb. 3.13: MRD-Auswertung für CD58 2/3

CD19⁺/CD34⁺-Zellen (R2), die gleichzeitig in R1 liegen, werden in Abb. (a) gegen CD58-FITC und CD10-PE aufgetragen. Markierung als potentiell leukämische Blasten durch R9. Gates R4 und R5 weisen dabei auf die Regionen der physiologischen Zellpopulationen hin. In Abb. (b) werden die Zellen daraufhin gegen CD34-PerCP und CD19-APC aufgetragen, um mit R10 die CD19⁻-Zellen besser einzugrenzen. Auftragung dieser Zellen im FSC/SSC (d), getrennt davon Auftragung ohne R10 (c).

Die weitere Auswertung erfolgte analog zur Auswertung von Erstdiagnosen für diese beiden Subpopulationen getrennt. Zellen aus R1 und R2 wurden in der zweiten Abbildung (Abb. 3.13) gegen CD58-FITC und CD10-PE aufgetragen.

In dieser Darstellung wurde das zum Zeitpunkt der Erstdiagnose um die Blastenpopulation gesetzte Gate R9 entsprechend der jetzigen Position der Blasten angepasst, die Regionen R4 und R5 bezeichnen dabei weiterhin Regionen gesunden regenerierenden Knochenmarks (Template-Proben). Die Zellen aus R9 wurden im nächsten Dot Plot gegen CD34 und CD19 durch „backgating“ zurück verfolgt (R1 + R2 + R9) und mit R10 eine genauere Auswahl der Blasten anhand ihrer Fluoreszenz für CD19 vorgenommen.

Schließlich wurden die Zellen einmal mit und einmal ohne R10 im FSC/SSC abgebildet, um ihre Zugehörigkeit zu Lymphozyten, Dubletten oder anderen Populationen zu bestimmen.

Dieser Auswertungsschritt erfolgte analog dazu für die CD19⁺/CD34⁻-Zellen (R3) aus Abb. 3.12. Das Ergebnis ist nachfolgend dargestellt, es findet sich im Blastengate R12 noch eine deutliche Zellpopulation, die auch im FSC/SSC vorwiegend im Bereich der Lymphozyten zur Darstellung kommt (s. Abb. 3.14).

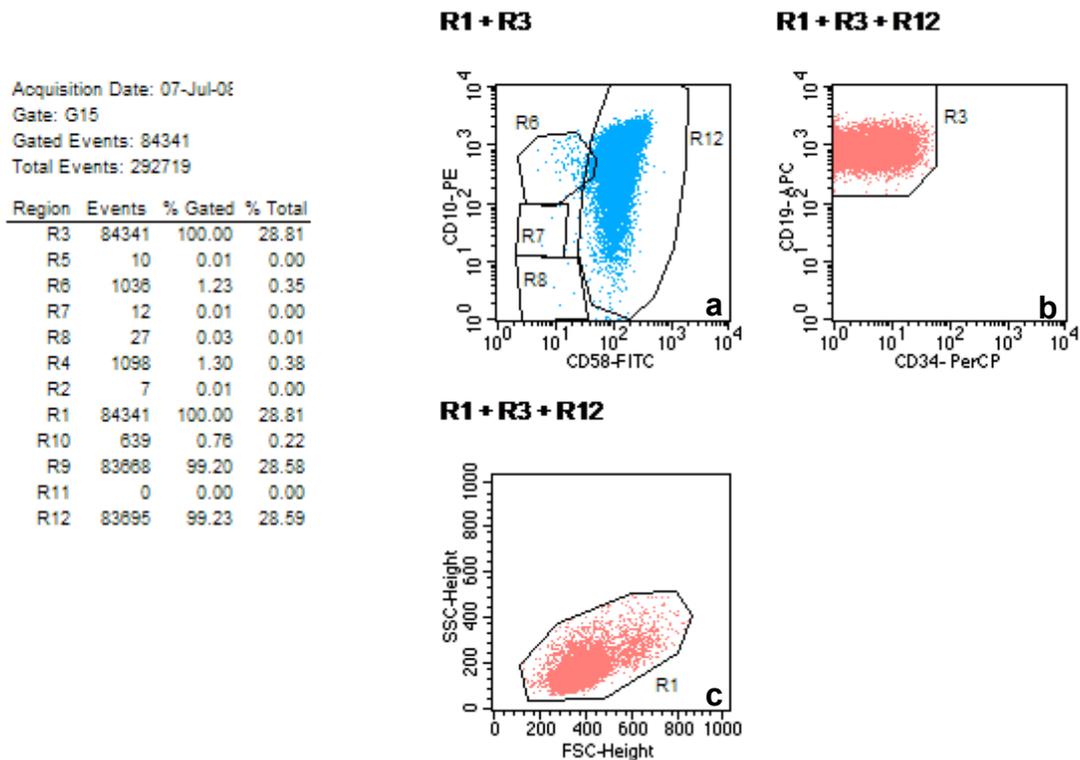


Abb. 3.14: MRD-Auswertung für CD58 3/3

Analog zur vorigen Abbildung werden hier die CD19⁺/CD34⁻-Zellen aus R3 (CD34⁻) untersucht. Potentielle Blasten werden in R12 gegatet (a) und auf ihre Eigenschaft als CD19⁺ überprüft (b). Physiologische Zellpopulationen liegen in R6, R7 und R8. Anschließend Backgating in FSC/SSC (c). Es zeigt sich in R12 eine deutliche Persistenz der Blasten.

Zur genauen Bestimmung des Anteils der Zellen mit aberrantem bzw. für CD38 und CD45 unterexprimierten, für CD58 überexprimierten Immunphänotyps mussten nun die Korrekturfaktoren berechnet werden. Dafür musste für die einzelnen Teströhrchen bekannt sein, wie hoch die gemessene Gesamtzellzahl lag. Da wir, um Rechenkapazität und Speicherplatz zu sparen, statt aller akquirierter Daten lediglich die gemessenen CD19⁺-Zellen abspeicherten (mit seltenen Ausnahmen im Falle hauptsächlich CD19-negativer Zellpopulationen), musste die Gesamtzellzahl manuell einzeln notiert und so für die Auswertung festgehalten werden.

An Korrekturfaktoren bestimmten wir dann zunächst den Debris-Faktor.

$$\text{Debris-Faktor} = \frac{10000}{\text{Anzahl der lebenden Zellen (R3 in Abb. 3.10)}}$$

Danach legten wir für die einzelnen Marker (hier CD58) den Prozentsatz von CD19⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl in diesem Test Tube fest:

$$\%CD19+ \text{ an der Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl der CD19-pos. Zellen (R2+R3 in Abb. 3.12)}}{\text{Gesamtzellzahl im CD58 Tube (manuell notiert)}} \times 100$$

Derselbe Prozentsatz wurde für die permeabilisierte Probe berechnet:

$$\%CD19+ \text{ (perm) der Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl der CD19-pos. Zellen (R2 in Abb. 3.11)}}{\text{Gesamtzellzahl im perm19 Tube (manuell notiert)}} \times 100$$

Dieser Anteil wurde direkt mit dem „Debris-Faktor“ multipliziert, das Produkt ist der korrigierte Anteil CD19⁺-permeabilisierter Zellen:

$$\%CD19+(\text{perm})_{\text{korr}} = \text{Debris-Faktor} \times \%CD19+ \text{ (perm)}$$

Der „Debris/Ery-Korrekturfaktor“ wurde schließlich berechnet durch:

$$\text{Debris/Ery-Faktor} = \frac{\%CD19+ \text{ (perm)}_{\text{korr}}}{\%CD19+}$$

Mithilfe des Debris/Ery-Faktors konnte nun der Anteil leukämischer Blasten korrigiert werden, dies wurde für jeden der einzelnen Follow-Up-MRD-Marker berechnet und ist hier für CD58 gezeigt.

$$\text{Blastenanteil für CD58} = \frac{\text{Blastenanzahl (R10 in Abb. 3.13+ R12 in Abb. 3.14)}}{\text{Gesamtzellzahl im CD58 Tube (manuell notiert)}}$$

$$\text{Blastenanteil, korrigiert} = \text{Blastenanteil für CD58} \times \text{Debris/Ery-Faktor}$$

Rechnet man dies für unseren Beispielpatienten durch, ergibt sich für den Marker CD58 die nachfolgende Auswertung:

Korrektur-Faktoren			
Maske "Debris-Template"			
Anzahl der lebenden Zellen (R3):	9771	Debris-Faktor=	1,0234367
nicht-permeabilisierte AK-Kombination (nicht CD15!)	CD58		
Anzahl der CD19 ⁺ Zellen:	84936		
Gesamtzellzahl (total events):	844845	Anteil %CD19+ =	10,0534418 %
permeabilisierte AK-Kombination	perm/19		
Anzahl der CD19 ⁺ Zellen:	62647	%CD19+(perm) =	15,4655311 %
Gesamtzellzahl (total events):	405075	%CD19+(perm), korrigiert =	15,8279921 %
		Debris/Ery-Faktor =	1,57438542
MRD-Berechnung			
nicht-permeabilisierte AK-Kombination	CD58		
Anzahl Blasten:	84046	Blasten (gerundet) =	9,94 %
Gesamtzellzahl (total events):	844845	Blasten, korrigiert =	15,66 %

Tab. 3.1: Korrigierte MRD-Auswertung für CD58

Bei dem untersuchten Patient war folglich zum Zeitpunkt dieser Messung noch eine recht hohe Blastenlast nachweisbar, der Anteil von Blasten an der Gesamtzahl der Leukozyten beträgt in diesem Fall 15,6 %. Es ist unverzichtbar, einen solchen Befund im Sinne des Monitorings der minimalen Resterkrankung weiter zu verfolgen, ggf. sogar eine Therapieeskalation zu empfehlen. Zur besseren Übersicht bot es sich besonders bei häufig punktierten Patienten an, die gemessenen Werte der MRD-Last, aufgetrennt nach den einzelnen Markern, in ein Diagramm einzutragen. Für den Fall dieses Beispielpatienten ergibt sich mit den Vorwerten für den Marker CD58 folgendes Diagramm:

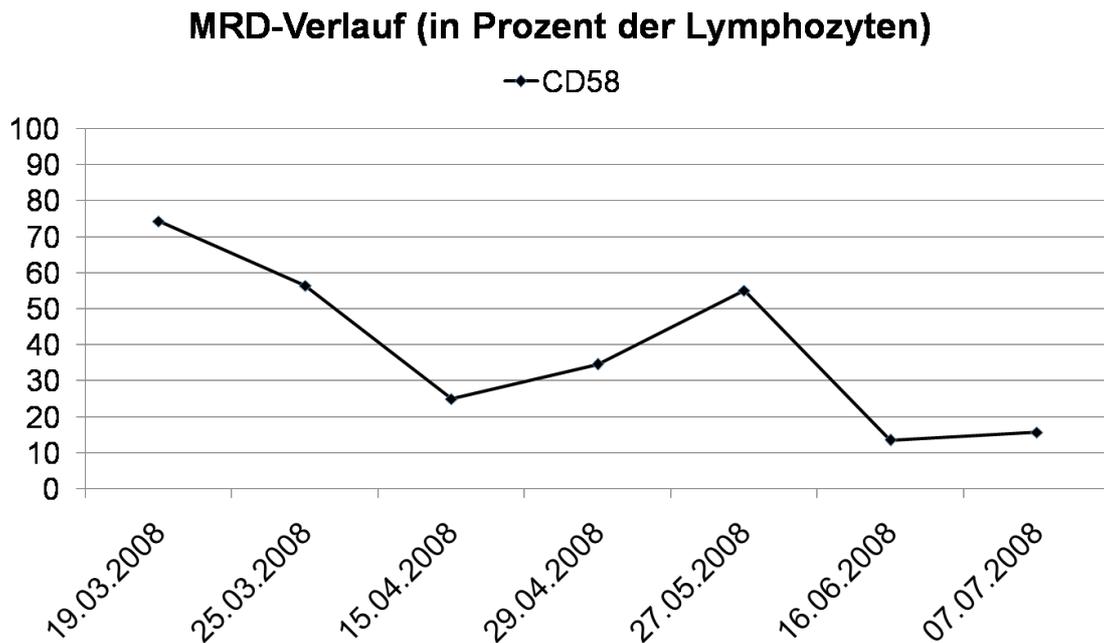


Abb. 3.15: MRD-Verlauf für CD58 (exemplarisch)

Die MRD-Last für den Marker CD58 zum Punktionszeitpunkt in Prozent ist über der Zeitachse mit dem jeweiligen Punktionsdatum aufgetragen.

Auf diese Weise führten wir am FACSCalibur die MRD-Analysen für die individuellen Marker des Patienten durch, die sich bei der Erstdiagnose als für das Follow-Up geeignet herausstellten. Die Nachweisgrenze für Blasten liegt dabei bei 1:10.000, d.h. 0,01 % (s. Diskussion); Ergebnisse unterhalb dieser Nachweisgrenze wurden daher nicht als MRD-negativ, sondern als „MRD unter der Nachweisgrenze“ bezeichnet.

3.4.2 Auswertung der Daten am LSR II

Die Auswertung der MRD-Daten am neu angeschafften BD LSR II Durchflusszytometer unterscheidet sich aufgrund des anderen Geräts, der neueren Software und selbstverständlich durch die Möglichkeit mehr als vier Farben gleichzeitig detektieren zu können grundlegend von den oben gezeigten Auswertungsstrategien am FACSCalibur. Sie zu konzipieren, zu überprüfen und für die Bestimmung der minimalen Resterkrankung zu realisieren, stellte einen der zentralen Punkte des Arbeitsprogramms dar und soll daher im Ergebnisteil erläutert werden (siehe Kap. 4.2.3: Entwicklung von Gating- und Auswertungsstrategien).

4 Ergebnisse

Die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in drei Teile. Zunächst soll die Optimierung der MRD-Analyse am vorhandenen 4-Farben-Durchflusszytometer FACSCalibur gezeigt werden. Dies schließt neben der Akquisition von Daten gesunder Kontrollproben die Entwicklung neuer Auswertungsstrategien mit ein. Den mittleren Teil macht die Übertragung der durchflusszytometrischen MRD-Analyse auf das neu angeschaffte 14-Farben-Durchflusszytometer aus, um die sich daraus ergebenden Vorteile zur Verbesserung der Methode nutzen zu können. Dazu waren neben einer seriellen Ausrüstung des Durchflusszytometers mit geeigneten Detektoren und Lasern die Entwicklung eines neuen Backbones, einer Lebend/Tot-Differenzierung sowie von neuen Gating- und Auswertungsstrategien und neuen Kontrollen gesunden Knochenmarks notwendig. Zuletzt ging es darum, die Ergebnisse auf Patientenproben anzuwenden, was an Einzelmessungen von B-ALL-Erstdiagnosen und MRD-Verlaufskontrollen mit Blick auf den klinischen Hintergrund demonstriert wird.

4.1 Optimierung der MRD-Analyse am FACSCalibur

Als erstes Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der MRD-Analyse auf dem vorhandenen 4-Farben-Durchflusszytometer FACSCalibur vorgesehen. Dazu war es zunächst notwendig, eine ausreichende Zahl von Kontrollproben mit den für die Auswertung der MRD eingesetzten Markern anzufärben und die Ergebnisse zu analysieren

Danach ging es um die Entwicklung neuer Auswertungsstrategien zur MRD-Bestimmung (Kap. 4.1.2) und in einem letzten Schritt sollte die Integration von HLA-Antikörpern ergänzend zum Nachweis aberranter Immunphänotypen in die MRD-Diagnostik geprüft werden (Kap. 4.1.3).

4.1.1 Integration regenerativer Kontroll-Proben

Um die bei unseren MRD-Messungen gefundenen auffälligen Zellen möglichst sicher verbliebenen Blasten der Leukämie oder aber unreifen regenerativen Zellen des Knochenmarks zuordnen zu können, war die Integration von mindestens sechs physiologischen KM-Proben in die Auswertungsmasken erforderlich. Während der Zeit der Anfertigung dieser Arbeit bearbeiteten wir insgesamt acht solcher Proben für das FACSCalibur, die wir frisch und für möglichst viele Marker färbten und analysierten (siehe Kap. 3.3.4.3: Planung und Messung von Templates und Tab. 2.2). Sukzessive konnten wir unsere MRD-Auswertungen auf diese Weise auf immer mehr Vergleichspatienten stützen. Die Integration von Kontrollgates für den sehr häufig festgelegten MRD-Marker CD38 soll hier stellvertretend für alle anderen untersuchten Marker (später auch analog mit neuen Proben am LSR II Cytometer) gezeigt werden.

Dazu führten wir zunächst ein großzügiges Gating auf Lymphozyten durch und trennten die gegateten Zellen in $CD19^+/CD34^-$, d.h. reife B-Zellen, und $CD19^+/CD34^+$, d.h. regenerierende B-Zellen auf (siehe Abb. 4.1). Die Zellen des Kontroll-Knochenmarks wurden anschließend in für diesen zwei Auswertungszweigen getrennt weiteranalysiert.

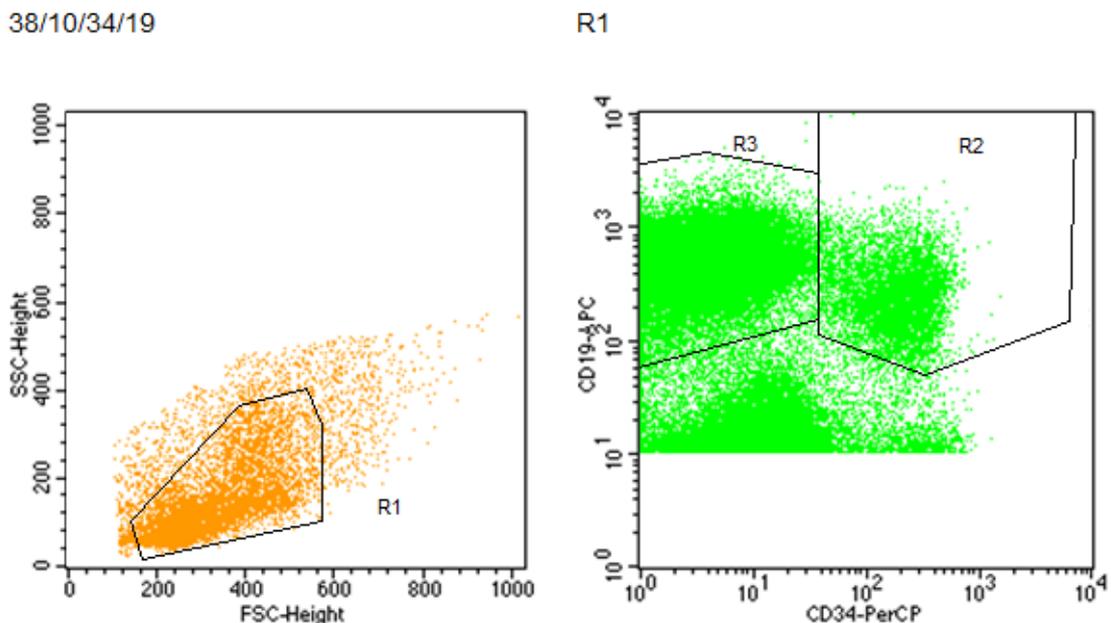
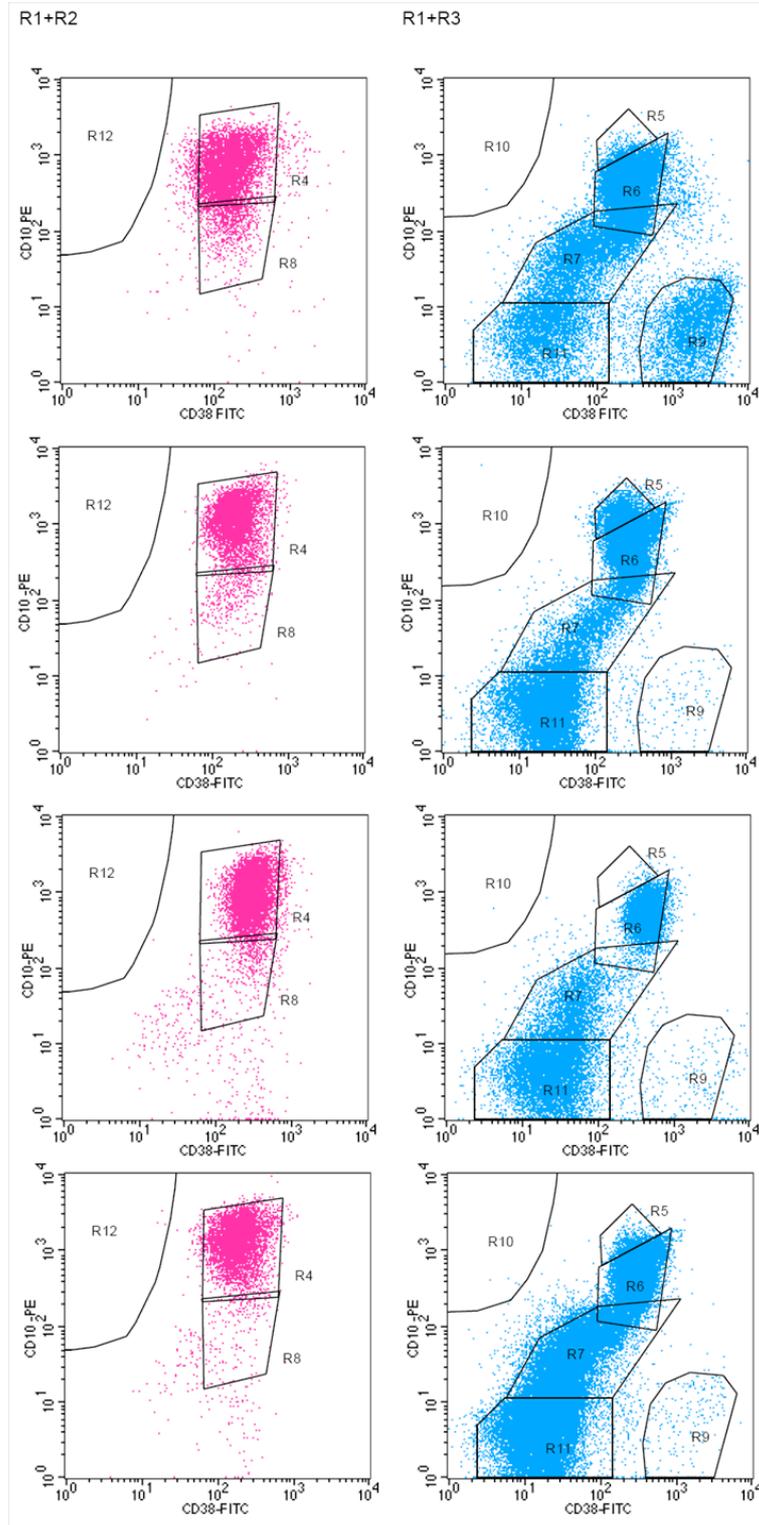


Abb. 4.1: Integration physiologischer Kontrollproben (1/2)

Zunächst wird mit R1 (links) großzügig auf Lymphozyten der Template-Probe gegatet. Diese Zellen werden im nächsten Dot Plot (rechts) in $CD34^+/CD19^+$ (R2) und $CD34^-/CD19^+$ (R3) aufgeteilt.

In Abb. 4.2 ist dies für insgesamt acht verschiedene Proben jeweils für den Marker CD38 dargestellt: Jeweils links die CD19⁺/CD34⁺-Zellen und rechts die CD19⁺/CD34⁻-Zellen. Im Dot Plot ist jeweils CD38 gegen CD10 aufgetragen. Mit Hilfe dieser Proben mussten nun die Kontrollgates definiert werden, die später für die Zuordnung von Zellen aus Patientenproben zu Blasten oder regenerierenden KM-Zellen wichtig waren. Da die Position der Zellen dieser Kontrollproben zwar stets relativ distinkt, jedoch nicht absolut kongruent war, musste eine Art Kompromiss für die Definition der Kontrollgates gefunden werden, um möglichst viele regeneratorische Zellen in die Kontrollgates einzuschließen, jedoch ohne diese Gates dabei größer als nötig festzulegen.

Ergebnisse



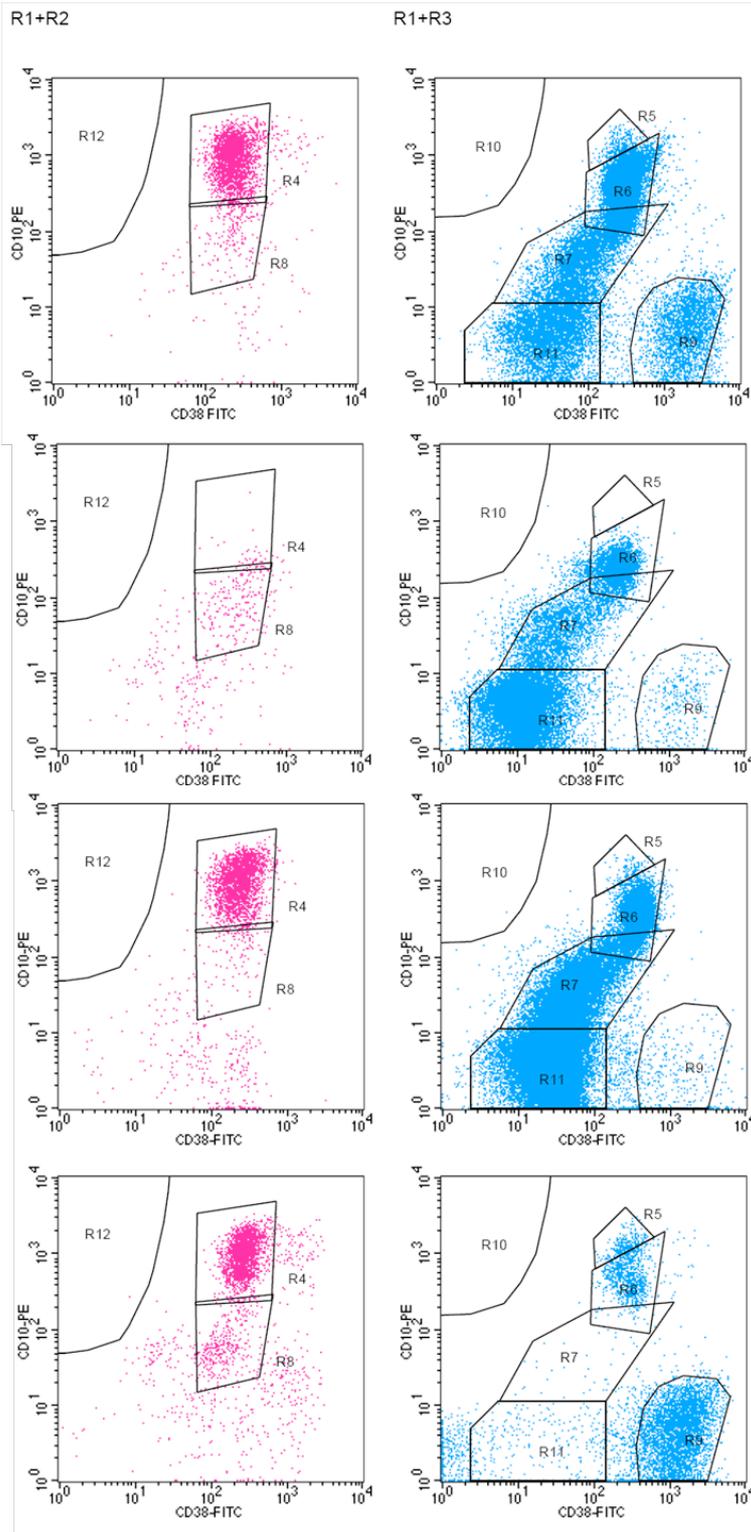


Abb. 4.2: Integration physiologischer Kontrollproben (2/2)

Dargestellt sind die Ergebnisse für CD38 von insgesamt 8 Template-Proben. Zunächst wird das in Abb. 4.1 gezeigte Gating angewendet (nicht abgebildet), dann jeweils links die Gates R4 und R8 als Kontrollgates für CD34⁺/CD19⁺-Zellen (R1 + R2 in Abb. 4.1) und jeweils rechts die Gates R5, R6, R7, R9 und R11 als Kontrollgates für CD34⁻/CD19⁺-Zellen (R1 + R3 in Abb. 4.1) definiert. Dabei muss ein Kompromiss gefunden werden, der möglichst viele Bereiche der acht Templates erfasst. Die dargestellten Gates zeigen eine Lösung dieses Kompromisses und somit die zukünftigen Kontrollgates für Patientenproben, bei denen CD38 als MRD-Marker definiert wurde.

Die Etablierung der Kontrollgates für die weiteren eingesetzten Marker erfolgte auf die gleiche Weise. Wir analysierten analog zu dem oben vorgestellten Beispiel zusätzliche Kontrollgates für die folgenden Marker:

Eingeschlossene Marker für Kontrollproben		
CD10	CD52	cμ (intrazellulär)
CD13	CD56	NG2
CD15	CD58	
CD21	CD65s	
CD33	CD66c	
CD45	TdT (intrazellulär)	

Tab. 4.1: Eingeschlossene Marker für Kontrollproben

Die aufgeführten Marker wurden in die Analyse der Kontrollproben am FACSCalibur eingeschlossen.

4.1.2 Entwicklung neuer Auswertungsstrategien

Die in den Kapiteln 3.4.1.1 und 3.4.1.2 vorgestellten Auswertungsstrategien erlaubten uns in vielen Fällen eine ausreichende MRD-Bestimmung unserer Patientenproben. In manchen Fällen, insbesondere bei MRD-Bestimmungen im Bereich der Nachweisgrenze stellten wir fest, dass die nach den vorgestellten Gatingstrategien verbliebenen potentiellen Blasten näher analysiert werden mussten, um sie eindeutig der anzunehmenden Blastenpopulation oder aber beispielsweise Dubletten zuzuordnen zu können. Wir gingen dieses Problem durch eine Überarbeitung unserer Auswertungsstrategie an. Dabei definierten wir bereits bei der Erstdiagnose des zu untersuchenden Patienten ein exakteres Gate R11 um die Hauptpopulation der Blasten als Sub-Gate des stets großzügig gewählten R1-Gates (Lymphozyten-Gate) (vergleiche Kap. 3.4.1.1 und 3.4.1.2, siehe Abb. 4.3). Dieses Gate wurde im FSC/SSC-Dot Plot mit Hilfe der dorthin zurückgategeten Blasten definiert (Backgating). Bei späteren MRD-Proben konnte durch diesen Schritt eine genauere Darstellung der Blasten durch Integration des R11-Blastengates in die Auswertung erreicht werden. Das

Ergebnis dieser Backgating-Strategie ist nachfolgend exemplarisch für einen Patienten mit CD58 als Leukämie-Marker veranschaulicht. Zunächst wird die unter den oben genannten Kapiteln gezeigte Auswertungsstrategie der Erstdiagnose dieses Patienten spaltenweise neben der späteren-MRD Situation und regenerierenden Kontrollen (Template) angewandt.

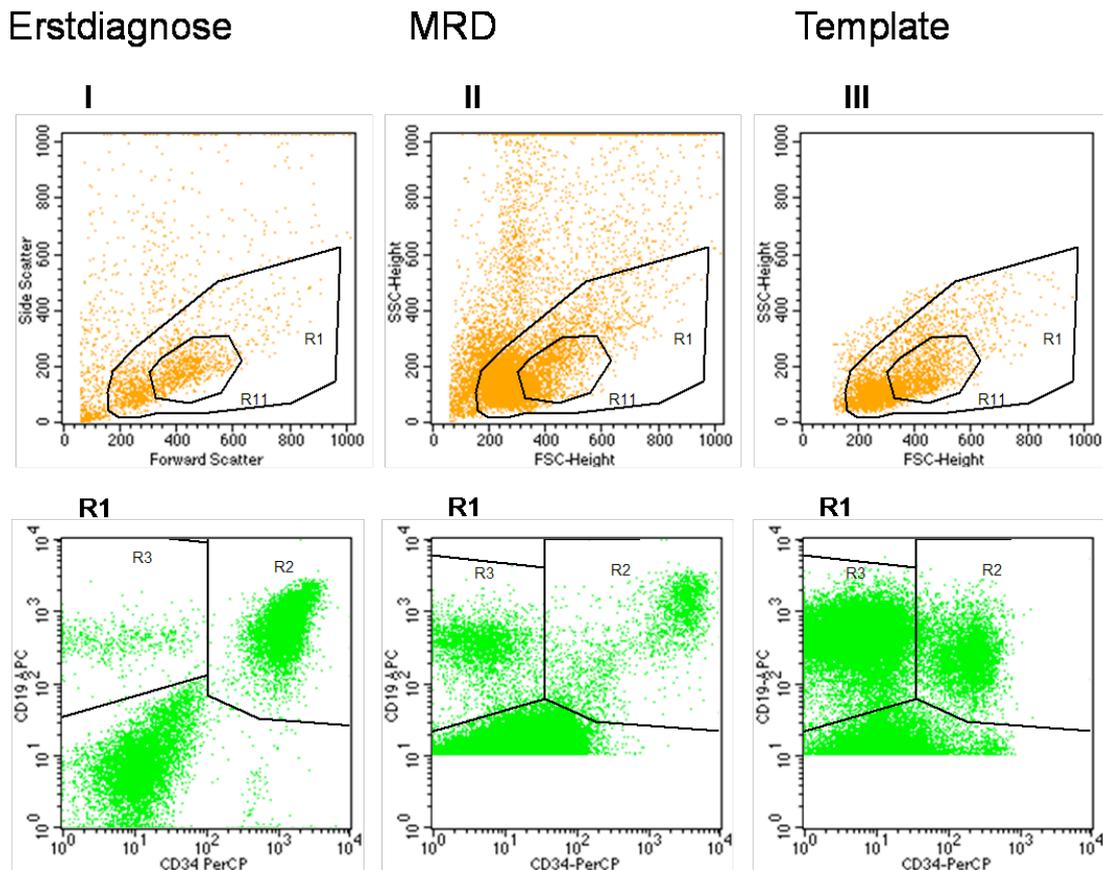


Abb. 4.3: Neue Auswertungsstrategie: Vorauswertung

Spaltenweise sind die Analysen von Proben einer c-ALL Erstdiagnose (Spalte I) mit späterer MRD-Follow-Up-Probe (Spalte II) neben der Analyse von physiologischem KM (Template, Spalte III) dargestellt. Zunächst jeweils großzügiges Gating auf Lymphozyten (R1, oben), danach Auftrennung dieser Zellen in CD34⁺/CD19⁻-Zellen (R2) sowie CD34⁻/CD19⁺-Zellen (R3, jeweils unten).

Anschließend werden die CD19⁺/CD34⁺-Zellen aus R2 jeweils für ED (Abb. 4.4a/d/g), MRD (Abb. 4.4b/e/h) und Template (Abb. 4.4c/f/i) weiteranalysiert: Mit R9 werden potentielle Blasten erfasst (Abb. 4.4a/b/c) und mit R10 eventuelle R2-randständige Zellen herausgated (Abb. 4.4d/e/f). Es folgt ein Backgating in den FSC/SSC Dot Plot (Abb. 4.4g/h/i) und die Definition des Gates R11 bei der ED (Abb. 4.4g). R11 wird für spätere MRD-Auswertungen übernommen.

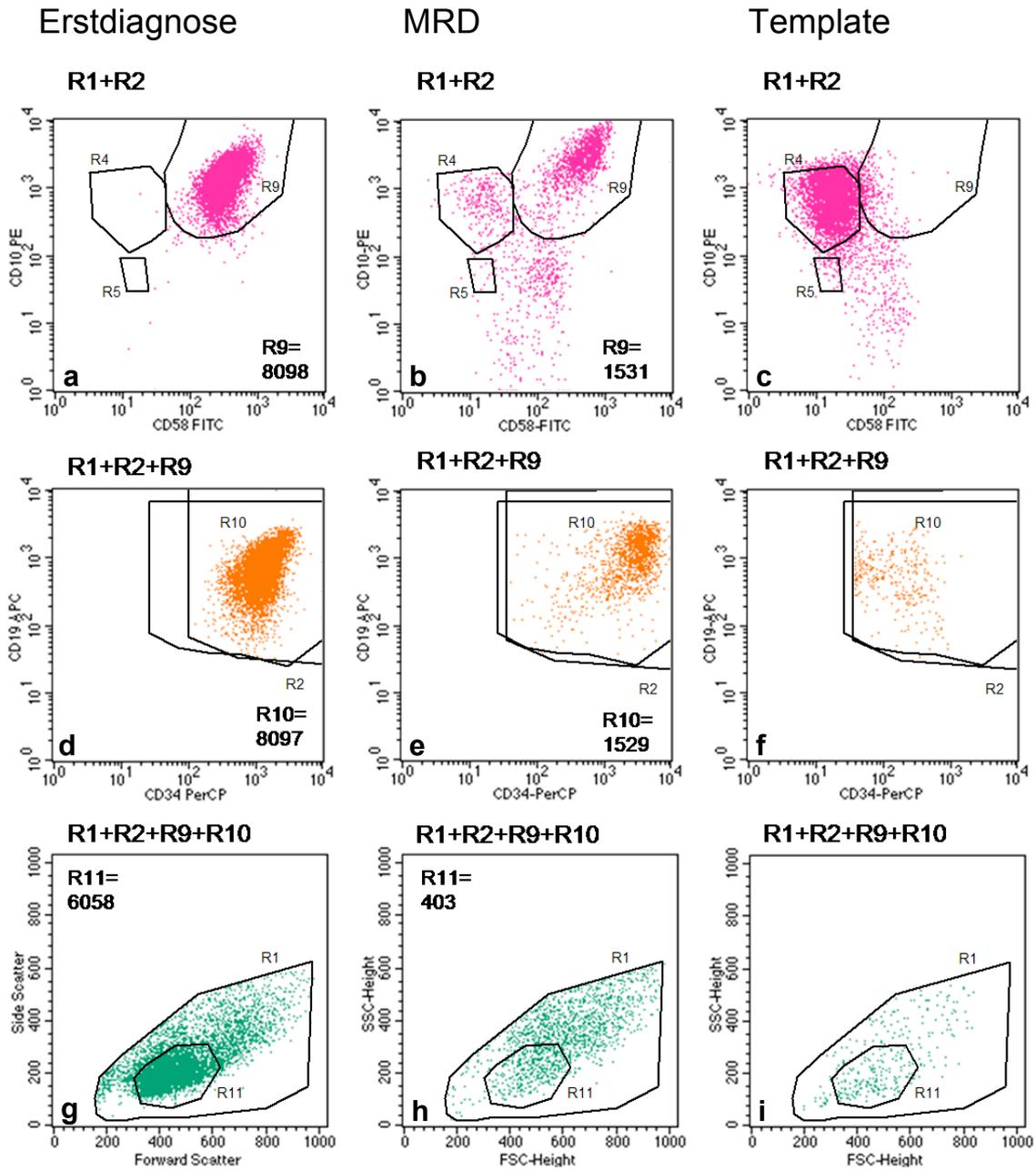


Abb. 4.4: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19⁺/CD34⁺-Zellen (1/2)

Spaltenweise sind die Analysen von Proben einer c-ALL-Erstdiagnose (a/d/g) mit späterer MRD (b/e/h) neben der Analyse von physiologischem KM (Template, c/f/i) dargestellt. Mit R9 werden bei der ED (a) und der MRD (b) die potentiellen Blasten erfasst und mit R10 die R2-randständigen Zellen heraus gegatet (d/e/f). R4 und R5 bezeichnen Bereiche physiologischer Zellpopulationen (vgl. Template). Unten werden die potentiellen Blasten ins FSC/SSC-Dot Plot zurück gegatet (g/h/i) und mit R11 bei der ED die Hauptpopulation der Blasten erfasst (g, restriktiv nach links und oben). R11 wird bei der MRD für die genauere Zuordnung von potentiellen Blasten zu tatsächlichen Blasten oder Doubletten weiterverwendet (h).

Zuletzt werden die mit R9 erfassten potentiellen Blasten nach Ausschluss eventueller randständiger Zellen durch R10 wieder im CD58/CD10-Dot Plot ausgegeben (Abb. 4.5a/b/c) und schließlich der jeweils gleichen Population mit zusätzlichem Gating auf R11 gegenübergestellt (Abb. 4.5d/e/f). In diesem Fall re-

duziert sich die relevante Blastenzahl bei der MRD-Probe von 1529 Blasten (Abb. 4.5b) auf 402 Blasten (Abb. 4.5e) und führt so zu einem deutlich niedrigeren Ergebnis in der Blastenquantifizierung für diesen Zweig der Auswertung.

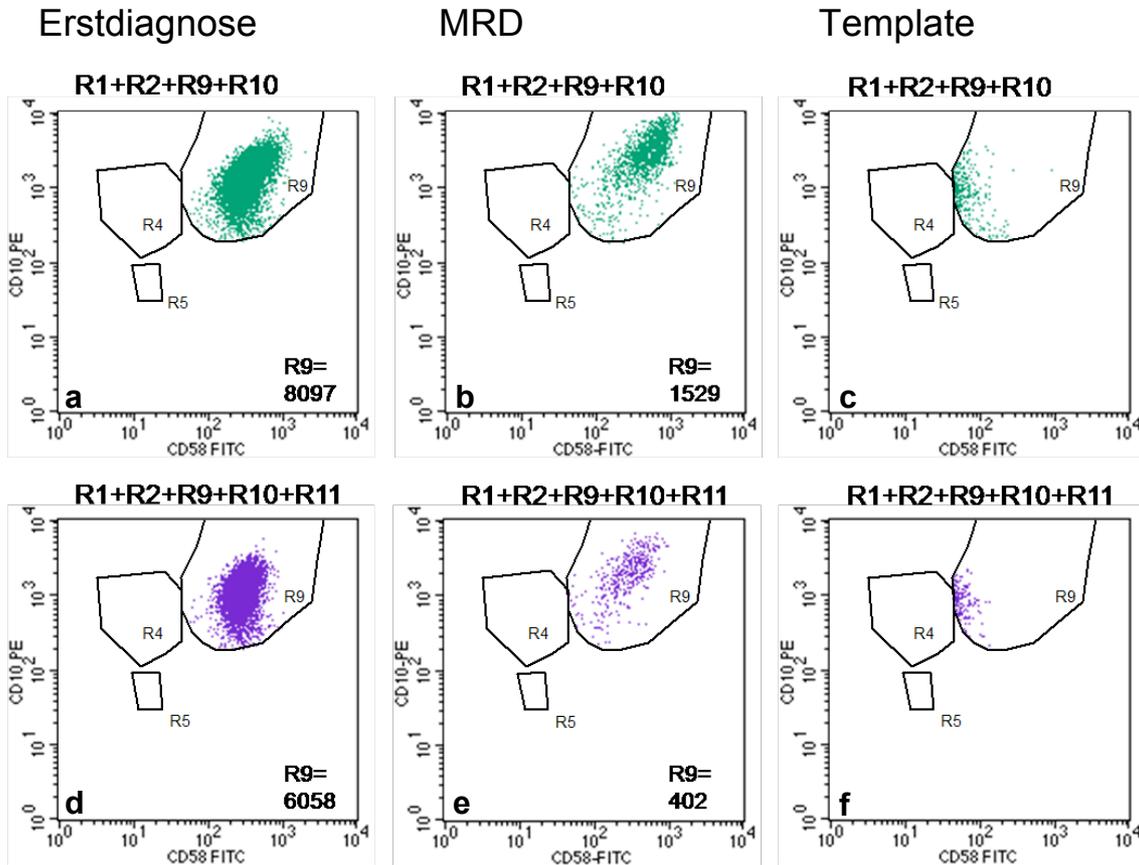


Abb. 4.5: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19⁺/CD34⁺-Zellen (2/2)

Spaltenweise sind die Analysen von Proben einer c-ALL-Erstdiagnose (a/d) mit späterer MRD (b/e) neben der Analyse von physiologischem KM (Template, c/f) dargestellt. R4 und R5 bezeichnen Bereiche physiologischer Zellpopulationen (vgl. Template). In den drei oberen Dot Plots werden die durch R1 und R10 gateden potentiellen Blasten angezeigt (a/b/c). In den drei unteren erfolgt die Darstellung nach R11-gestütztem Gating. Es wird deutlich, dass sich unter den potentiellen Blasten in der MRD-Situation viele Doubletten und damit falsch positive Blasten befinden, da die Anzahl der gateden Zellen in R9 durch das zusätzliche Gate R11 von 1529 (b) auf 402 (e) verringert wird.

Analog zu den CD19⁺/CD34⁺-Zellen aus R2 (s. Abb. 4.3) werden die gezeigten Schritte für die Zellen aus R3 (CD19⁺/CD34⁻, s. Abb. 4.3) wiederholt:

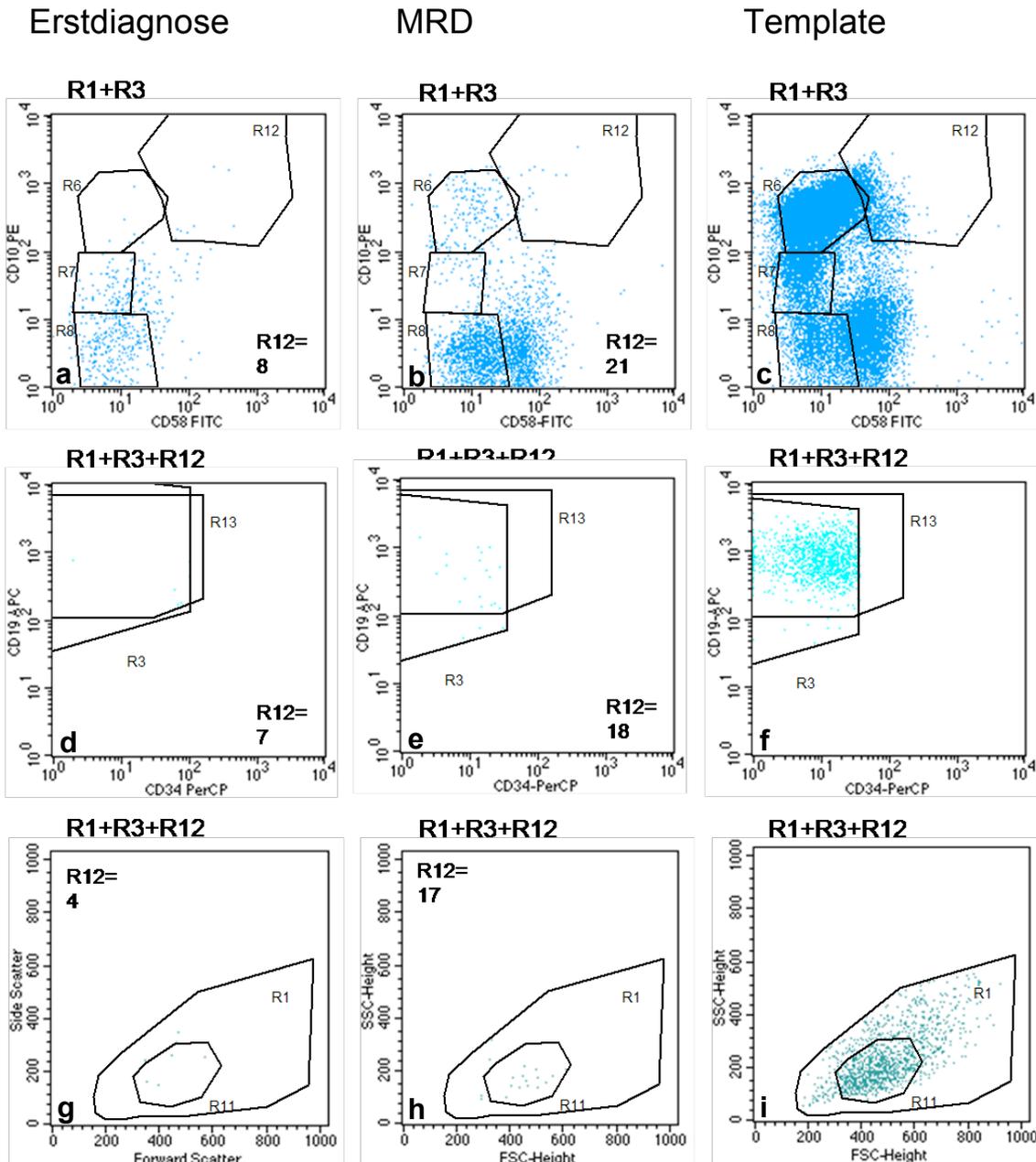


Abb. 4.6: Neue Auswertungsstrategien: Analyse der CD19⁺/CD34⁻-Zellen (1/2)

Spaltenweise sind die Analysen von Proben einer c-ALL-Erstdiagnose (a/d/g) mit späterer MRD (b/e/h) neben der Analyse von physiologischem KM (Template, c/f/i) dargestellt. Mit R12 werden bei der ED und der MRD die potentiellen Blasten erfasst (a/b) und mit R13 die R3-randständigen Zellen heraus gegatet (d/e/f). R4 und R5 bezeichnen Bereiche physiologischer Zellpopulationen (vgl. Template). In den drei untersten Dot Plots werden die potentiellen Blasten ins FSC/SSC-Dot Plot zurück gegatet (g/h/i) und mit R11 bei der ED die Hauptpopulation der Blasten erfasst (g, restriktiv nach links und oben). R11 wird bei der MRD für die genauere Zuordnung von potentiellen Blasten zu tatsächlichen Blasten oder Doubletten weiterverwendet (h). In diesem Fall zeigten die Blasten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose größtenteils CD34⁺/CD19⁺, sodass bei diesem Zweig der Auswertung erwartungsgemäß wenig Zellen auftauchen. R11 wurde daher von der Auswertung der CD34⁺/CD19⁺-Hauptblastenpopulation (Abb. 4.4g) übernommen.

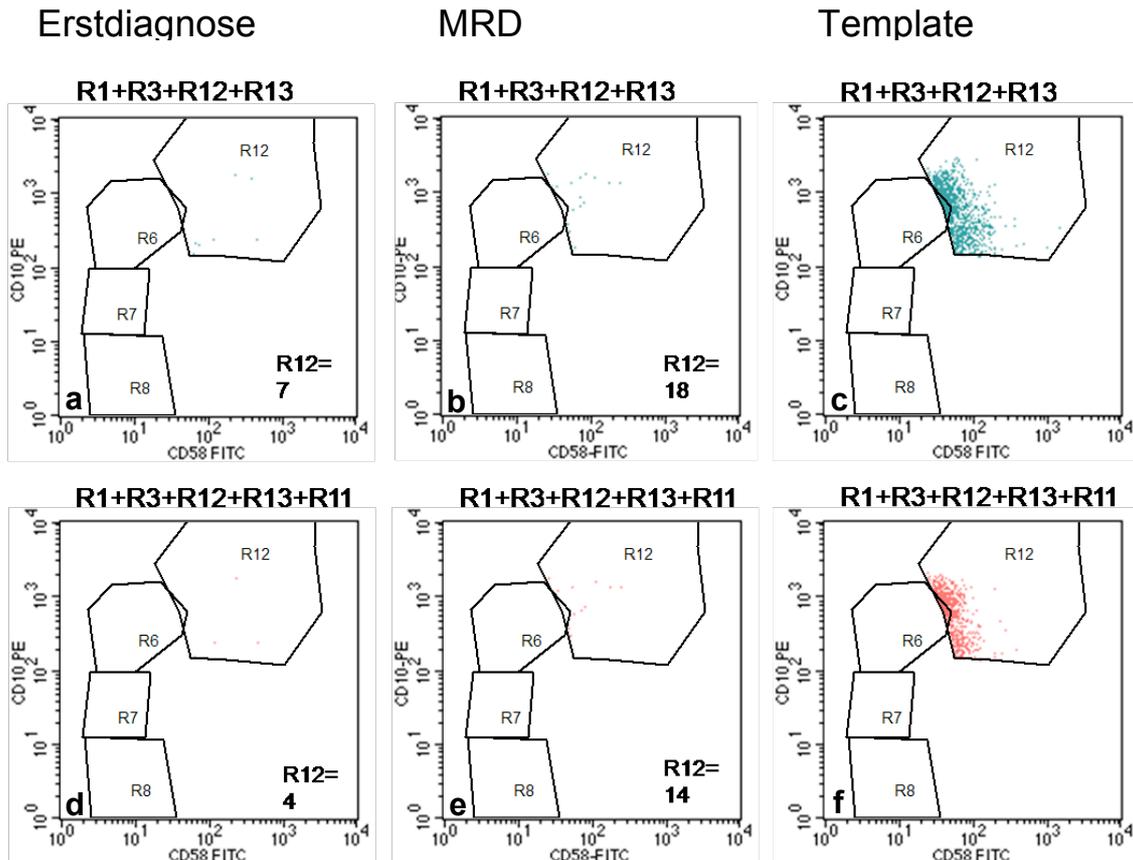


Abb. 4.7: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19⁺/CD34⁻-Zellen (2/2)

Spaltenweise sind die Analysen von Proben einer c-ALL-Erstdiagnose (a/d) mit späterer MRD (b/e) neben der Analyse von physiologischem KM (Template, c/f) dargestellt. R4 und R5 bezeichnen Bereiche physiologischer Zellpopulationen (vgl. Template). In den drei oberen Dot Plots werden die durch R1 und R13 gateden potentiellen Blasten angezeigt (a/b/c). In den drei unteren erfolgt die Darstellung nach R11-gestütztem Gating. In diesem Zweig der Auswertung verringert sich die Anzahl der gateden Zellen in R12 durch das zusätzliche Gate R11 von 18 (b) auf 14 (e) Zellen.

In diesem zweiten Zweig der Auswertung ergibt sich in der Blastenquantifizierung eine Reduktion der relevanten Blasten von 18 (Abb. 4.7b) auf 14 (Abb. 4.7e) durch die Integration des Blastengates R11. Die gezeigten zusätzlichen Auswertungsstrategien konnten in schwierigen Fällen eine Absicherung unseres Befundes bewirken. Durch diese Methode erfolgt zusammenfassend eine Aufreinigung der potentiellen Blastenpopulation gegenüber toten Zellen oder Dubletten. Die Anzahl der falsch positiven Zellen kann auf diese Weise verringert werden.

4.1.3 MRD-Bestimmung mittels HLA-Antikörpern

Die Bestimmung der minimalen Resterkrankung in unserem Labor basierte bislang auf dem Einsatz von Antikörpern gegen sogenannte CD-Antigene (cluster of differentiation) oder gegen intrazelluläre Moleküle. Obwohl uns eine große Palette an Antikörpern hierfür zur Verfügung stand, gab es bisweilen doch Patienten, für die kein Marker gefunden werden konnte, mit dem die leukämischen Blasten sicher von physiologischen KM-Zellen differenzierbar gewesen wären. Mit der Verwendung von Antikörpern gegen HLA-Antigene im Rahmen der MRD-Messungen entstand eine weitere Möglichkeit auch bei solchen Patienten noch einen Marker für den Verlauf der MRD zu finden. In Frage kam dieses Vorgehen bei allogenen transplantierten Patienten, bei denen sich durch eine haploidentische Transplantation (Mismatch in 3-5 HLA-Allelen) eine Differenz für bestimmte HLA-Antigene ergeben hatte. Bei haploidentisch transplantierten Patienten stehen so weitere Marker zur Verfügung, die die Sensitivität der MRD-Messung erhöhen können, bzw. bei schwierigem Nachweis überhaupt erst ermöglichen können. Oftmals handelte es sich dabei um HLA-A2/28-FITC, die weiteren eingesetzten HLA-Antikörper sind in Tab. 2.17 aufgeführt. Nachfolgend soll die Durchführung dieser Möglichkeit an einem Beispielpatienten veranschaulicht werden. Im gezeigten Fall handelt es sich um einen im Alter von 10 Jahren an einer c-ALL (Ph+, keine Meningeosis) erkrankten Jungen, der 8 Monate nach Therapiebeginn ein Rezidiv der Leukämie erlitt und 7 Wochen später eine haploidentische Knochenmarktransplantation erhielt. Für HLA-A2/28 ergab sich dadurch eine geänderte Konstellation (Spender A2/28-positiv, Patient A2/28-negativ). Die folgenden Auswertungen sind das Ergebnis fortlaufender Messungen nach der Transplantation:

Die erste Messung führten wir an Tag 62 nach Transplantation durch. Es erfolgte zunächst ein großzügiges Gating auf Lymphozyten (R1 in Abb. 4.8) und anschließend eine Auftrennung dieser Zellen in $CD19^+/CD34^+$ (R2) und $CD19^+/CD34^-$ (R3), die getrennt weiteruntersucht wurden.

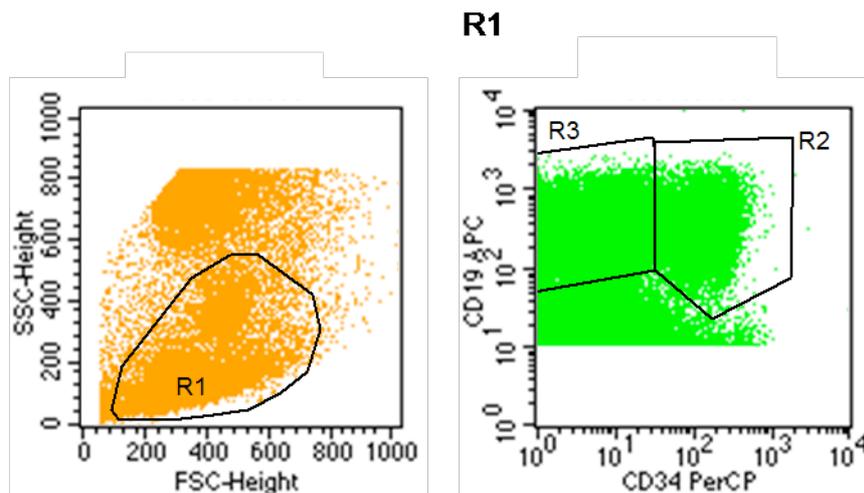


Abb. 4.8: HLA-Analyse Tag 62 n. KMT (1/2)

Zunächst wird mit R1 (links) großzügig auf Lymphozyten der gegatet. Diese Zellen werden im nächsten Dot Plot (rechts) in CD34⁺/CD19⁺ (R2) und CD34⁺/CD19⁻ (R3) aufgeteilt.

Für den R2-Zweig wurden mit dem Gate R4 (Abb. 4.9a) verbliebene A2/28-negative Zellen vom Empfänger erfasst, mit R5 (Abb. 4.9d) geschah dies für Zellen aus dem R3-Zweig. R4 und R5 wurden damit auf CD10-positive Zellen (CD10-positive c-ALL, sogenannte CALLA.) gelegt, die gleichzeitig HLA-A2/28-negativ, d.h. autologe Zellen waren. Der größte Teil der analysierten Zellen stellte sich A2/28-positiv dar, was damit Donorzellen entsprach und ein gutes Engraftment des Transplantats belegte. Die potentiellen Blasten summierten sich in diesem Fall auf insgesamt 15 (11 aus R4, s. Abb. 4.9a, und 4 aus R5, s. Abb. 4.9d). Nach der Korrekturrechnung ergab sich eine MRD-Last von 3×10^{-5} (0,003 %), d.h. unter der Nachweisgrenze.

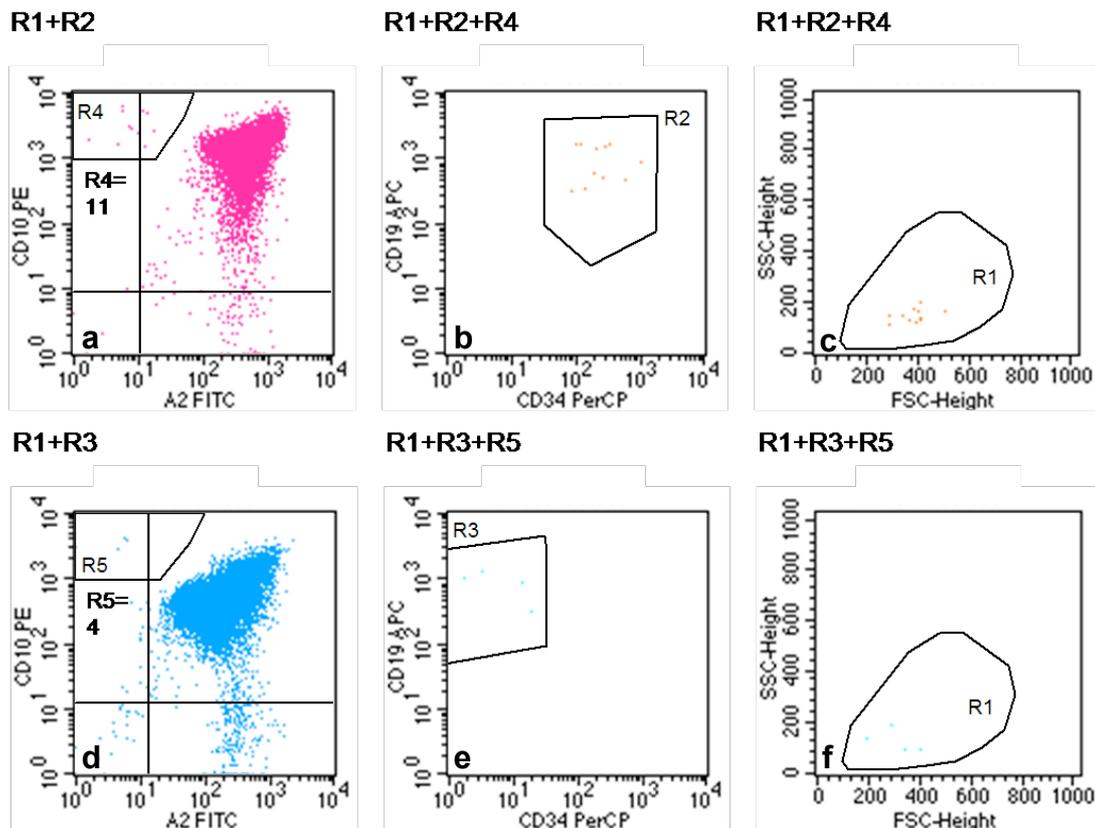


Abb. 4.9: HLA-Analyse Tag 62 nach KMT (2/2)

Anschließend werden in den oberen drei Dot Plots (a/b/c) die CD34⁺/CD19⁺-Zellen (R1+R2), in den unteren drei Dot Plots (d/e/f) die CD34⁻/CD19⁺-Zellen (R1+R3) analysiert und dazu zunächst gegen CD10 und A2/28 aufgetragen (a/d). Es zeigt sich eine deutliche Population der A2/28-positiven allogenen B-Zellen neben nur sehr wenigen autologen B-Zellen des Empfängers (R4 bzw. R5). Diese autologen Zellen wurden gemäß der zuvor beschriebenen Auswertungsstrategie (b/c, bzw. e/f, s. Kap. 3.4.1.2) analysiert. Für die 15 potentiell verbliebenen Blasten (R4+R5) ergibt sich nach der Korrekturrechnung eine MRD-Last von 3×10^{-5} (0,003 %), d.h. unter der Nachweisgrenze.

Im weiteren Verlauf ergab sich ein Rezidiv der Erkrankung an Tag 109 nach KMT. Die Analyse ergab eine MRD-Last von 49,55 % für autologe Blasten. Für die Auswertung erfolgte die Trennung der autologen von Donor-B-Zellen in einem früheren Schritt, um proliferierende Blasten des Patienten gründlicher von Spenderzellen differenzieren zu können. Dazu erfolgte wiederum zunächst ein Gating auf Lymphozyten (Abb. 4.10a) und anschließend mit R2 ein Gating auf HLA-A2/28-negative, d.h. autologe Zellen (Abb. 4.10b), sowie mit R3 ein Gating auf A2/28-positive Zellen, d.h. Donorzellen (Abb. 4.10b). Potentielle autologe Blasten werden mit R12 (Abb. 4.10c) im CD34/CD10-Dot Plot erfasst und durch Backgating in den A2/28/CD19-Dot Plot (Abb. 4.10d) auf ihre A2/28-Negativität geprüft. Die in Abb. 4.10 gezeigte Auswertung gibt somit die deutliche Zunahme

der autologen Blasten und deren hohe Expression von CD10 (CALLA-Marker) wieder.

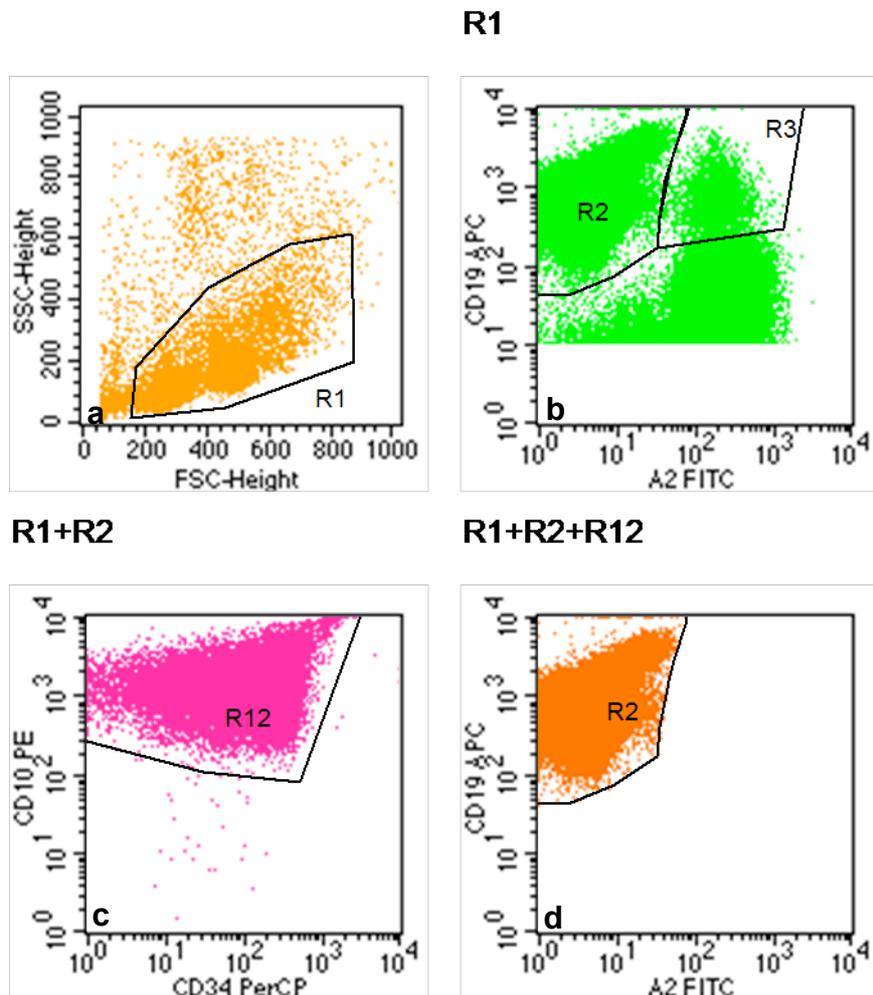


Abb. 4.10: HLA-Analyse Tag 109 nach KMT

Zunächst wird mit R1 (a) großzügig auf Lymphozyten gegatet. Diese Zellen werden im nächsten Dot Plot (b) in A2/28⁻ und CD19⁺-Zellen (R2) gegenüber A2/28⁺ und CD19⁺ (R3) aufgeteilt. Zellen in R2 entsprechen somit autologen, Zellen in R3 allogenen B-Zellen. Da in die Auswertung dieses Rezidivs lediglich die autologen B-Zellen eingehen sollen werden diese in einem ersten Schritt in R2 (b) erfasst. Diese Zellen werden nun gegen CD34/CD10 aufgetragen (c) und mit R12 als typische CALLA Blasten (CD10⁺) erfasst. Um zu differenzieren, ob es sich bei den erfassten Zellen um deutlich A2/28-negative B-Zellen oder im Dot Plot randständig erfasste Zellen handelt erfolgt ein Backgating von R12 gegen A2 und CD19 (d). Die Analyse ergibt 49,55 % autologe Blasten.

Analog zur gezeigten Auswertung geben Abb. 4.11 und Abb. 4.12 weitere Messungen an Tag 130, 138, 167, 187, 201 und 223 wieder.

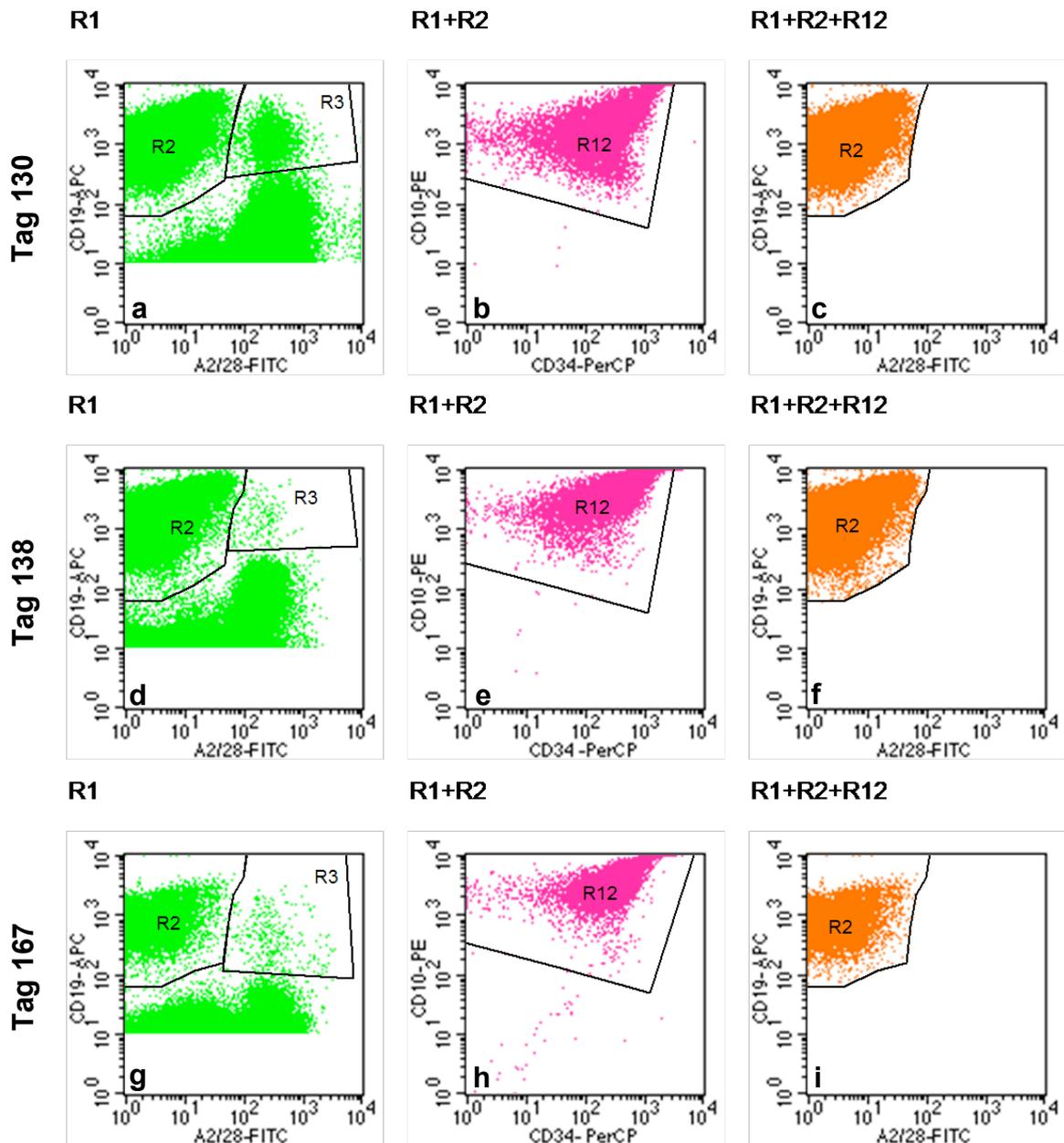


Abb. 4.11: HLA-Analyse Tag 130, 138 und 167 nach KMT

Es erfolgt primär das in der vorigen Abbildung beschriebene Gating auf autologe, d.h. A2/28-negative B-Zellen (R1-Gate um Lymphozyten in Abb. 4.10a, nicht abgebildet) und anschließend die weitere Analyse dieser Zellen (a, R2). Tag 130 ist dabei in den drei oberen (a/b/c), Tag 138 in den drei mittleren (d/e/f) und Tag 167 in den drei unteren Dot Plots (g/h/i) dargestellt. Es ergeben sich für Tag 130 33,94 % Blasten, für Tag 138 85,01 % Blasten und für Tag 167 3,00 % Blasten (unter Dasatinib Dauertherapie und Chemotherapie mit Vincristin, Alkaran und Decortin).

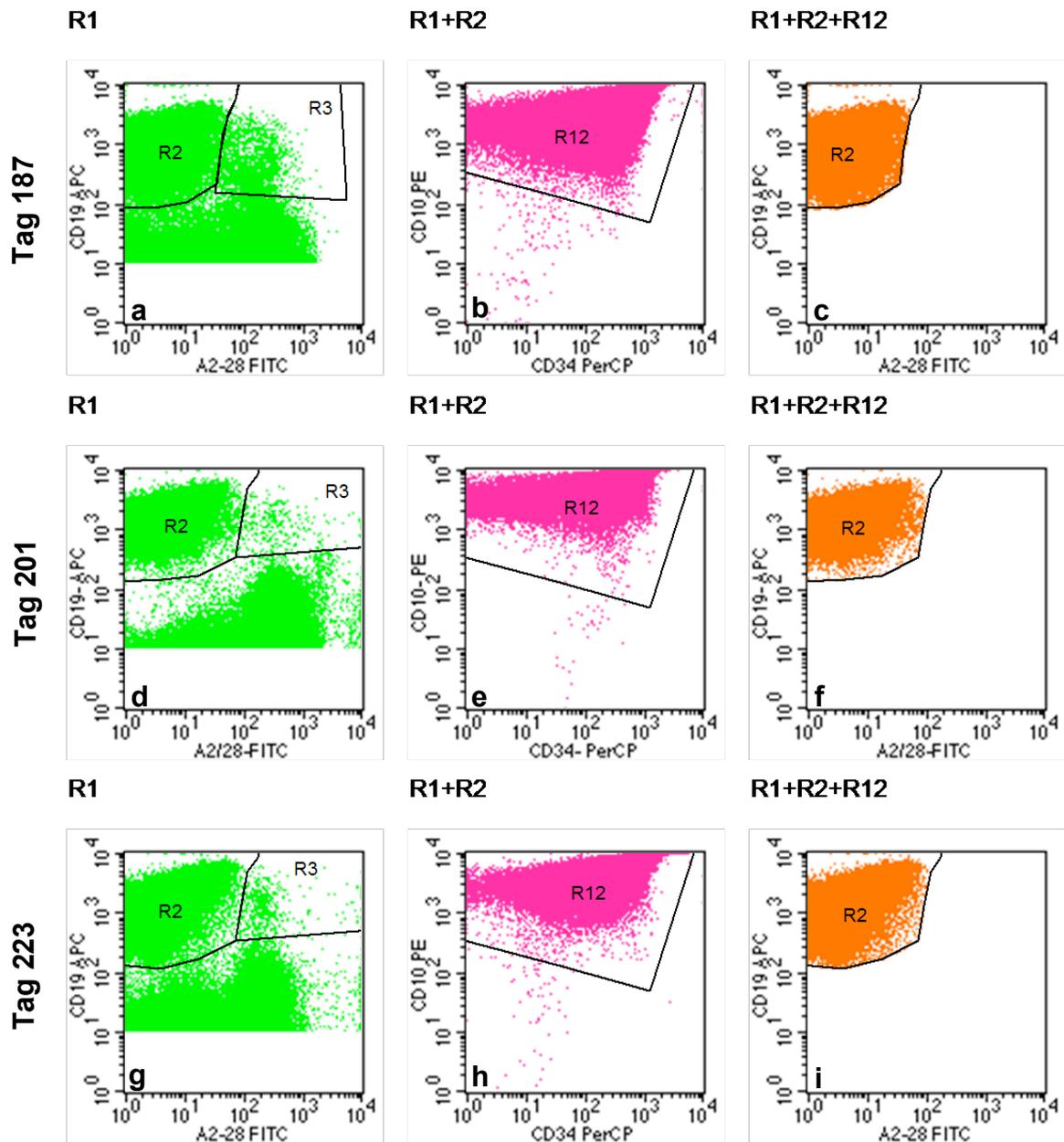


Abb. 4.12: HLA-Analyse Tag 187, 201 und 223 nach KMT

Es erfolgt primär das in Abb. 4.10 beschriebene Gating auf autologe, d.h. A2/28-negative B-Zellen (R1-Gate um Lymphozyten in Abb. 4.10a, nicht abgebildet) und anschließend die weitere Analyse dieser Zellen (a, R2). Tag 187 ist dabei in den drei oberen (a/b/c), Tag 201 in den drei mittleren (d/e/f) und Tag 223 in den drei unteren Dot Plots (g/h/i) dargestellt. Es ergeben sich für Tag 187 58,32 % Blasten, für Tag 201 27,08 % Blasten und für Tag 223 49,95 % Blasten (unter Fortführung der Chemotherapie mit Vincristin, Alkaran und Decortin).

Der Patient verstarb schließlich an den Folgen seines therapie- und transplationsrefraktären Rezidivs. Nachfolgendes Diagramm zeigt den Verlauf seines autologen Blastenanteils unter Polychemotherapie mit Hilfe des eingesetzten Markers HLA-A2/28.

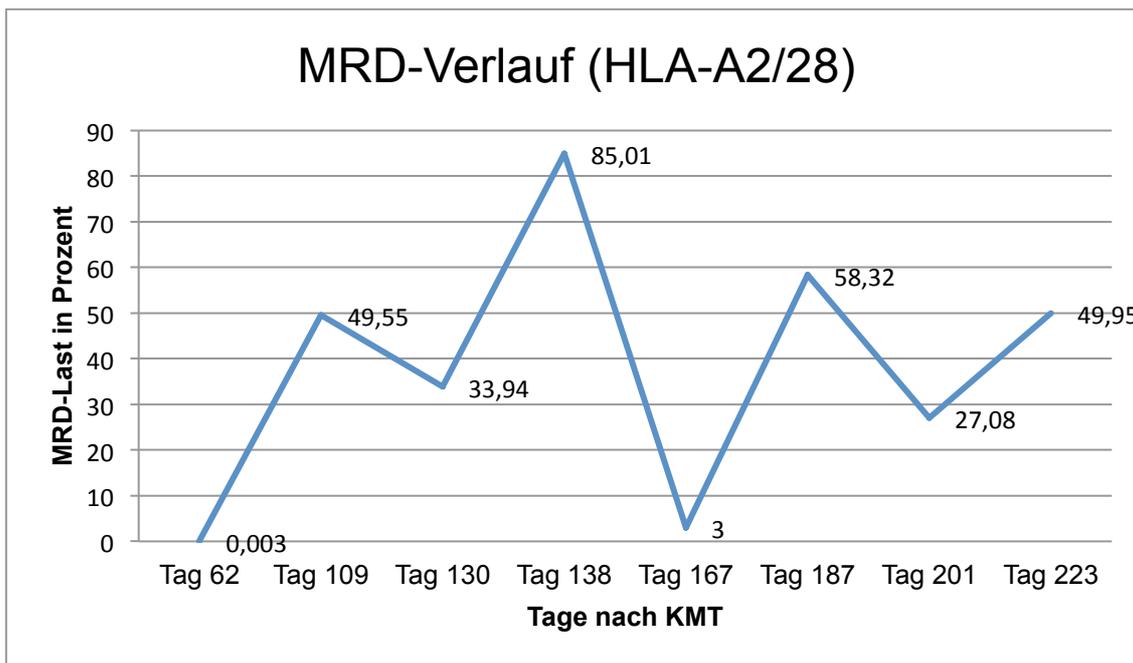


Abb. 4.13: MRD-Last im Verlauf für HLA-A2/28

Der erkennbare stark schwankende Verlauf lässt sich durch unterschiedliche Chemotherapieintensivierungen gegenüber therapielimitierenden Komplikationen erklären. Die Diagnose des Rezidivs nach KMT erfolgte an Tag 109. Unter einer palliativen kombinierten Chemotherapie mit Vincristin, Melphalan, Arsen und Decortin kam es im weiteren Verlauf neben Pneumocystis-jirovecii-Pneumonien und akuten Enteritiden zu einer Meningeosis leucaemica und zwei weiteren Schüben der Erkrankung (Verlauf Tag 109 bis Tag 187). Dieser Verlauf und die entsprechend schwankende MRD-Last erklären sich durch toxizitätsbedingte Therapiedeeskalationen.

Trotz eines erneuten Therapieversuchs mit Nilotinib kam es im weiteren Verlauf nach einer kurzen Phase der Blastenreduktion (Tag 201) zu einem erneuten Schub des ALL-Rezidivs an Tag 223 mit Todesfolge an Tag 250.

Die Erfassung des MRD-Verlaufs anhand des Markers HLA-A2/28 korrespondierte wie abgebildet im gesamten Verlauf der Erkrankung gut zur klinischen Situation.

4.1.4 Zusammenfassung des Kapitels

Um die klinisch bedeutsamen Auswertungen der MRD am vorhandenen 4-Color-Durchflusszytometer zu optimieren, definierten wir zunächst geeignete Regionen physiologischer Kontrollen für die spätere Zuordnung aberranter Zellen zur Blastenpopulation oder Population regenerativer Zellen. Diese Kontrollen bestimmten wir anhand von acht regenerativen KM-Proben für insgesamt 15 MRD-taugliche Antigene, darunter auch zwei intrazelluläre Marker. Um eine exaktere Blastenquantifizierung vornehmen zu können, entwickelten wir einen neuen Auswertungsalgorithmus durch Einführung eines weiteren Gates in die Auswertungsmasken zum Backgating von suspekten Zellpopulationen in den FSC/SSC-Dot Plot. Auf diese Weise können falsch positive oder tote Zellen sowie Zell-Dubletten durch eine weitere Aufreinigung der Zellen von der MRD-Bestimmung ausgenommen werden. Bei Patienten, für die beispielsweise aufgrund Fehlens einer ausreichend aberranten Expression innerhalb des untersuchten Antikörper-Panels kein geeigneter CD-Antikörper zur Verfügung stand, prüften wir an einem klinischen Fall eines ALL-Rezidivs nach haploidentischer Knochenmarktransplantation konsekutiv das Prinzip der MRD-Bestimmung durch HLA-Antigene, um die MRD zu verfolgen.

4.2 Transfer und Etablierung der MRD am LSR II

Während der Entstehung der vorliegenden Arbeit wurde das neu angeschaffte Durchflusszytometer BD LSR II mehrmals auf- und umgerüstet. Die zuletzt bestehende Konfiguration mit insgesamt vier Lasern und 15 Detektoren ermöglichte uns die Messung der minimalen Resterkrankung von B-ALL Patienten mit Hilfe von bis zu 14 Farben synchron statt wie bisher mit lediglich vier Farben. Diese Erweiterung der maximal einsetzbaren Farben zählte zu den wichtigsten Neuerungen am LSR II. Durch die gleichzeitige Detektierbarkeit dieser neuen Fluorochrome im selben Teströhrchen konnten wir Probenmaterial einsparen, was insbesondere bei sehr niedrigen Zellzahlen wie bei MRD-Proben von Tag 15 der ALL-Therapie, an dem meist eine therapieinduzierte Aplasie des Knochenmarks vorliegt, einen entscheidenden Vorteil darstellt. Aus demselben Grund verringerte sich auch die pro Patient benötigte Anzahl von Teströhrchen. Darüberhinaus erzielten wir mit dem neuen Durchflusszytometer höhere Messgeschwindigkeiten, das zeitaufwändige Messen des gesamten Volumens pro Teströhrchen wurde dadurch deutlich verkürzt. Um gleichbleibende Ergebnisse zu erhalten, waren regelmäßige Wartungen und Kontrollen am neuen Durchflusszytometer notwendig. Mit unterschiedlichen Einstellungen von sowohl Software (Ansteuerung der Detektoren) als auch Hardware (unterschiedliche Filter und Spiegel) führten wir zahlreiche Neukompensationen und Kalibrierungen durch, um schließlich eine Möglichkeit zu finden, die MRD-Messungen in guter Qualität und reproduzierbar (durch die Möglichkeit zur späteren Kompensation nach bereits erfolgter Messung) zu realisieren.

Im Gegensatz zu den bisherigen Messungen standen uns am neuen Gerät durch die neu hinzugekommenen Kanäle nun erweiterte Möglichkeiten zum Ausschluss unerwünschter Zellen zur Verfügung. Die Etablierung einer Lebend/Tot-Differenzierung stellte eine wichtige Neuerung dar. Um unsere Messungen gegenüber physiologischen oder regenerierenden Zellen des Knochenmarks zu validieren, war es erneut erforderlich, entsprechende Kontrollproben zu verarbeiten und zu analysieren (siehe Tab. 2.3: Untersuchte Templates am LSR II Durchflusszytometer). Mithilfe der Erfahrungen vom FACSCalibur Durchflusszytometer erfolgte dies für die dort als wichtig befundenen Marker

(siehe Abb. 8.5: Markerkombinationen für B-ALL-Templates am LSR II). Die Ergebnisse dieser Arbeit und ihre erfolgreiche Anwendung auf klinisch wichtige Patientenproben sollen in den nun folgenden Kapiteln gezeigt werden. Bei der Auswahl der Patienten spielten wiederum die Erfahrungen mit den bisherigen Messungen am FACSCalibur eine wichtige Rolle, so erfolgten beispielsweise auch am LSR II viele Messungen mit Markern, die sich bereits beim FACSCalibur als wichtig herausgestellt hatten.

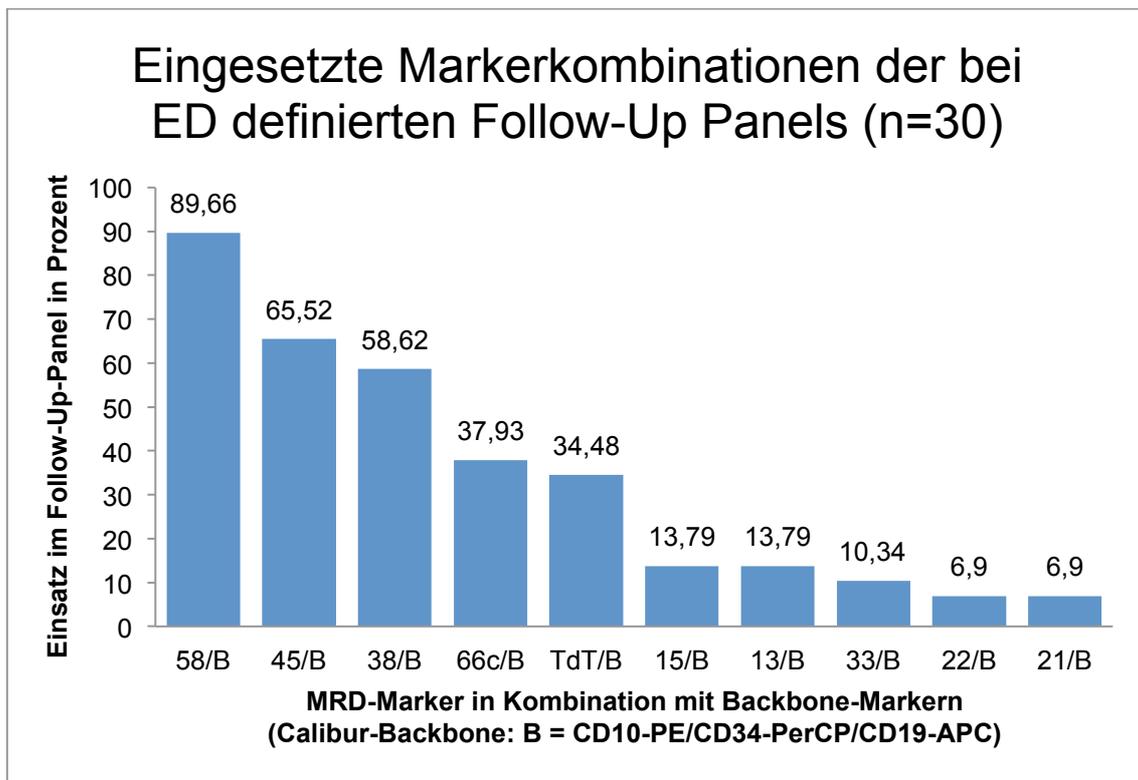


Abb. 4.14: Häufig eingesetzte Markerkombinationen am FACSCalibur

Dargestellt ist eine Rangfolge der am häufigsten eingesetzten Marker zur MRD-Bestimmung am FACSCalibur in FITC in Kombination mit dem am FACSCalibur etablierten 3-Farben-Backbone CD10-PE/CD34-PerCP/CD19-APC. Für das am LSR II entwickelte Backbone siehe Tab. 4.4: 10-Farben-Backbone (LSR II)

4.2.1 Ergebnisse der Lebend/Tot-Assays

Ein bedeutsamer Schritt auf dem Weg, die MRD-Messungen am neuen Durchflusszytometer LSR II weiter zu verbessern, war die Etablierung einer Differenzierung von lebenden und toten Zellen, um sowohl bei frischem Probenmaterial als auch bei der Verwendung von kryokonservierten Zellen die Viabilität der untersuchten Zellen in die Auswertung integrieren zu können. Zu diesem Zweck

untersuchten wir die unkonjugierte Form verschiedener Farbstoffe, sogenannte „reactive dyes“, die in mit Antikörpern konjugierter Form für die Durchflusszytometrie eingesetzt werden (vergleiche Kap. 3.2.5: Lebend/Tot-Differenzierung mittels Fluorochromen).

Von den insgesamt acht getesteten Dyes (siehe Kap. 2.8.2) stellte sich AlexaFluor 350 als der am besten geeignete heraus. Durch den im Gerät installierten UV-Laser (325 nm) konnte ein Detektor dieses Lasers für AlexaFluor350 benutzt werden und wir erreichten selbst in einer Verdünnung von 1:10 noch gute Kompensationsergebnisse. Wir etablierten folgendes Protokoll für die Lebend/Tot-Differenzierung mit AlexaFluor350:

1. Zellsuspension im FACS-Röhrchen mit PBS einstellen, pro 10^6 Zellen 1 ml PBS, max. 4 ml PBS zugeben (4 - 8×10^6 Zellen waren bei den meisten MRD-Messungen ausreichend).
2. Zugabe von 1 μ l AF350 (1:10) pro ml PBS.
3. Inkubation für 10 Minuten im Dunkeln bei RT.
4. Auffüllen des Röhrchens bis 5 ml mit PBS und Zentrifugation (3 Minuten bei 450 G und RT).
5. Auffüllen des Röhrchens bis 5 ml mit PBSA und erneute Zentrifugation.

Die AlexaFluor350-Färbung konnte vor oder nach der direkten Färbung mit Antikörper-konjugierten Fluorochromen erfolgen. Um dieses Ergebnis zu validieren, führten wir über insgesamt 7 Tage einen Test mit frischen Spenderblutzellen durch. Dabei testeten wir neben der Viabilität der Zellen auch die Eignung mehrerer Media, um unsere Zellen aufzubewahren. Ein kleines Aliquot der in jeweils kleinem Volumen (200 μ l) von 5 verschiedenen Media im Kühlschrank gelagerten Zellen wurde an Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4 und Tag 7 morgens zunächst mit CD14 gefärbt, um später Monozyten herausgaten zu können, und anschließend mit AF350 gefärbt und sogleich gemessen. Bei der Auswertung (s. Abb. 4.15) wurde nach Auswahl der Zellen im time window (Abb. 4.15a) zunächst auf mononukleäre Zellen gategatet, deren Lage im FSC/SSC bekannt ist (Abb. 4.15b). Nach Gating auf diese Zellen wurden die darunter befindlichen

CD14-negativen Zellen, d.h. Nicht-Monozyten (Abb. 4.15c), ausgewählt und schließlich im AF350-Width/AF350-Area Dot Plot analysiert (Abb. 4.15d). Im gezeigten Beispiel für das Medium PBS zeigte sich an Tag 1 lediglich eine Population (Abb. 4.15d), da erwartungsgemäß noch annähernd alle Zellen vital waren.

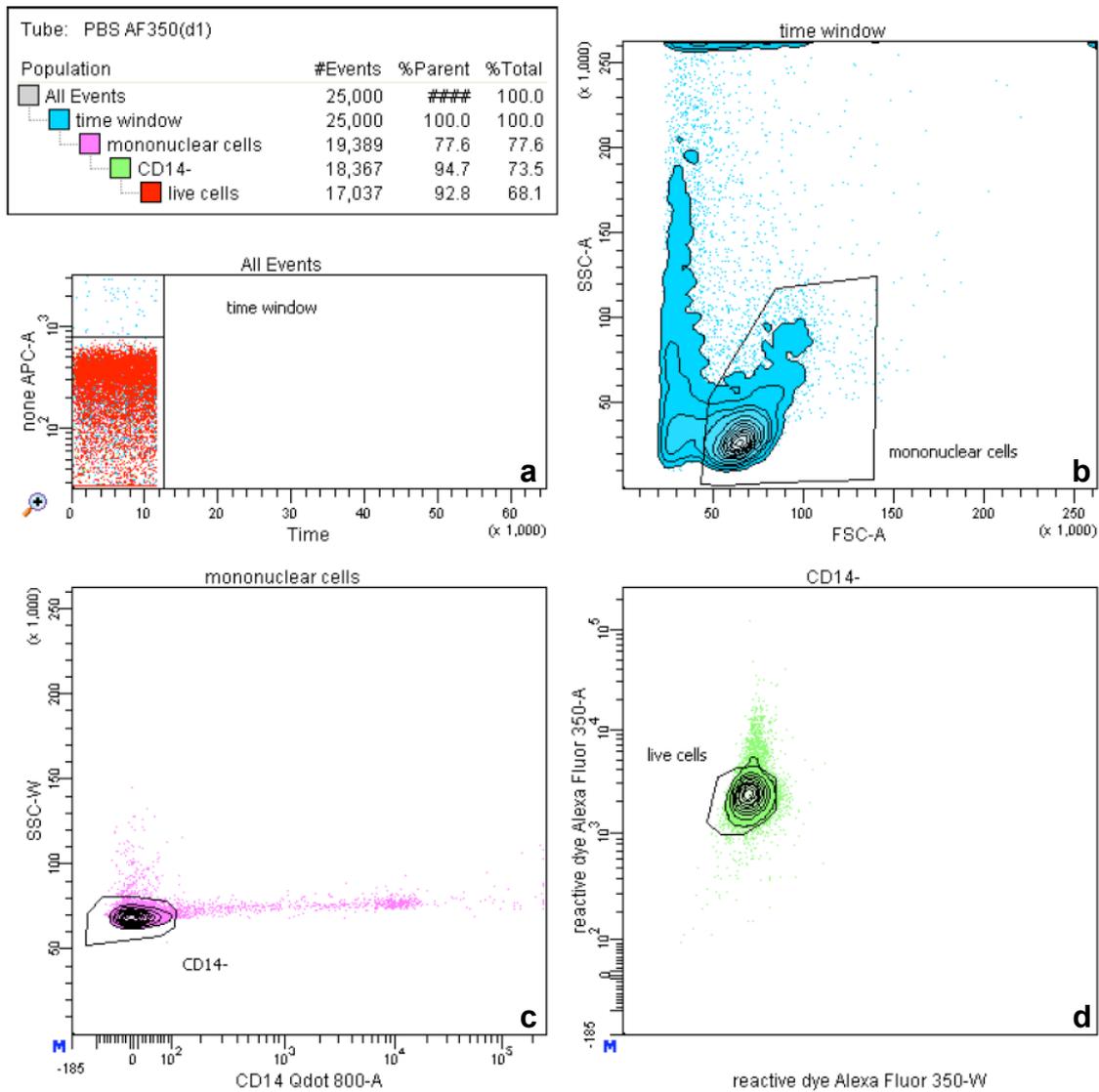


Abb. 4.15: Media/Viability-Test (PBS, Tag 1)

Analyse der in PBS aufbewahrten Spenderblutzellen nach voriger Färbung mit CD14-Qdot800 und AF350. Die nach der Zeit gegateten Zellen (a, time window) werden im FSC/SSC-Dot Plot angezeigt (b). Es folgt Gating auf mononukleäre Zellen, deren charakteristische Lage im FSC/SSC bekannt ist (b, Gate mononuclear cells). Die darunter CD14-negativen (d.h. nicht monozytären) Zellen werden ausgewählt (c, Gate CD14-) und schließlich im AF350-Width/AF350-Area-Dot Plot ausgegeben (d). In dieser Probe vom ersten Tag sind erwartungsgemäß viele Zellen im Gate „live cells“ (d) akkumuliert. Durch die Miterfassung der AF350-Width können zudem Dubletten mittels Begrenzung des Gates „live cells“ nach rechts ausgenommen werden.

Zu der Population der in der gezeigten Analyse im Gate „live cells“ (Abb. 4.15d) erfassten Zellen zeigte sich im zeitlichen Verlauf des Versuchs eine zunehmende Population toter Zellen oberhalb der „live cells“-Population, was einer zunehmenden Anfärbung mit AF350 durch zunehmende Schädigung der Zellmembran entspricht. Abb. 4.16 zeigt diese zunehmende Entwicklung der avitalen Zellen oberhalb des Gates für lebende Zellen im PBS-Medium für die Tage 1 bis 7 neben einer abnehmenden Population der live-cells.

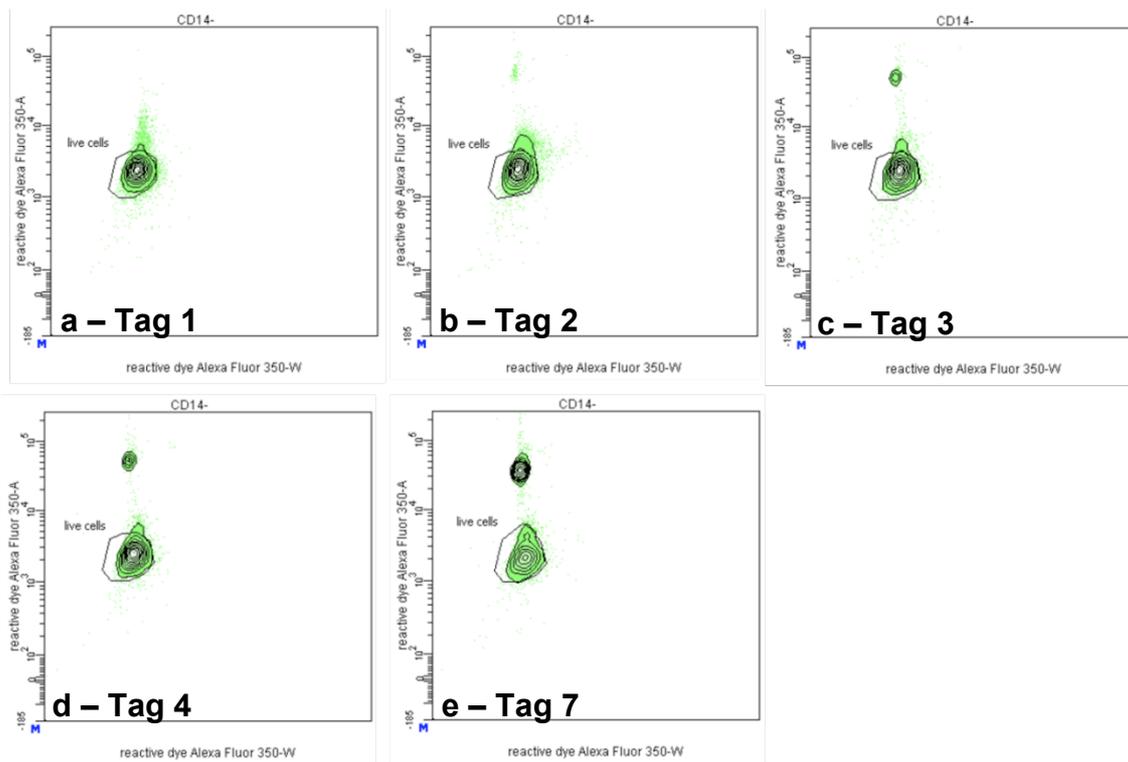


Abb. 4.16: Entwicklung einer zunehmenden Population avitaler Zellen (PBS, Tag 1-7)

Dargestellt sind die Dot Plots von Tag 1 (a), Tag 2 (b), Tag 3 (c), Tag 4 (d) und Tag 7 (e), die in Abb. 4.15 gezeigte Gating-Strategie erfolgte analog jeweils vorab. Es zeigt sich eine zunehmende Population von toten Zellen neben abnehmenden Populationen lebender Zellen (Konturlinienverdichtung bzw. Konturlinienverweiterung).

Die weiteren Auswertungen erfolgten für die fünf untersuchten Media PBS, PBSA, MACS⁺, DMEM⁻ und DMEM⁺. Grundsätzlich scheint das Vorhandensein von Protein im Medium (PBSA, MACS⁺, DMEM⁺) das Überleben der Zellen positiv zu beeinflussen (siehe Abb. 4.17). Bei der Analyse der lebenden Zellen unter den CD14-negativen Zellen, welche eher den für die MRD wichtigen Zielzellen entsprechen, zeigt sich ein relativ gutes Überleben der Zellen über den untersuchten Zeitraum (siehe Abb. 4.18).

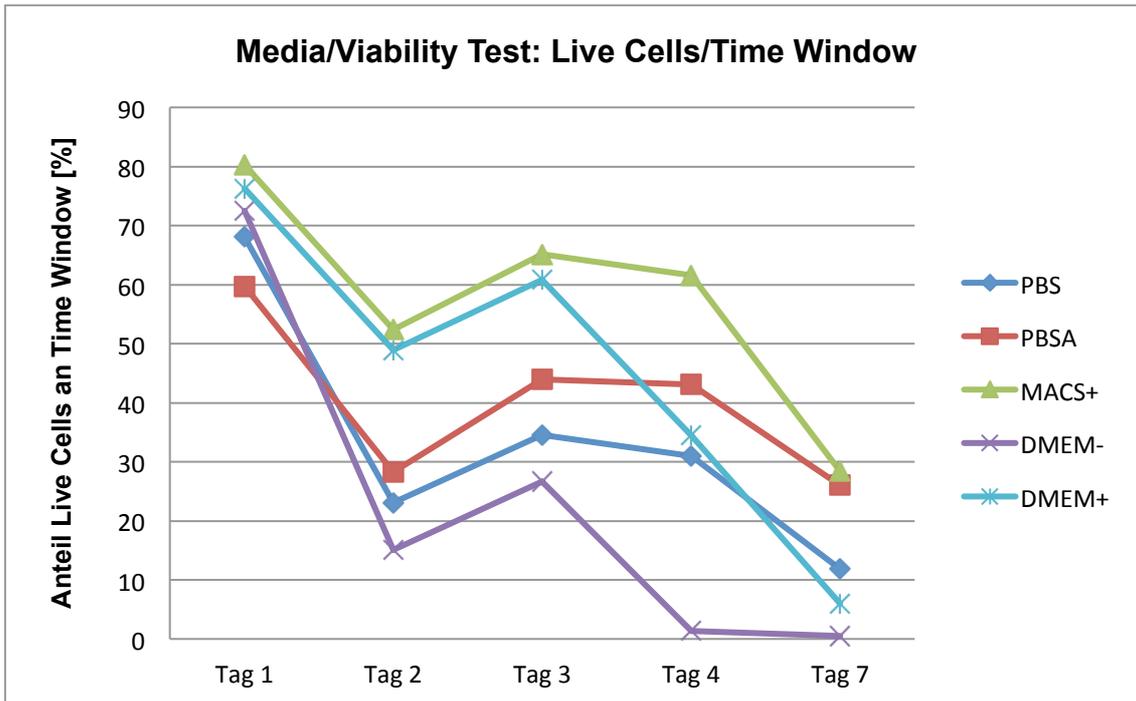


Abb. 4.17: Abnahme der Zellvitalität in unterschiedlichen Media

Das Diagramm zeigt die absteigende Vitalität als Ergebnis des abnehmenden Anteils von Zellen im Gate „live cells“ an den im time window gateden Zellen (siehe Abb. 4.15) für die fünf unterschiedlichen Medien. Am besten scheinen sich proteinhaltige Media wie MACS⁺, DMEM⁺ oder PBSA für die Aufbewahrung der Zellen zu eignen. Der für alle Media erkennbare Einbruch an Tag 2 ist durch das starke Absterben von Granulozyten im Zeitfenster zwischen Tag 1-2 erklärbar.

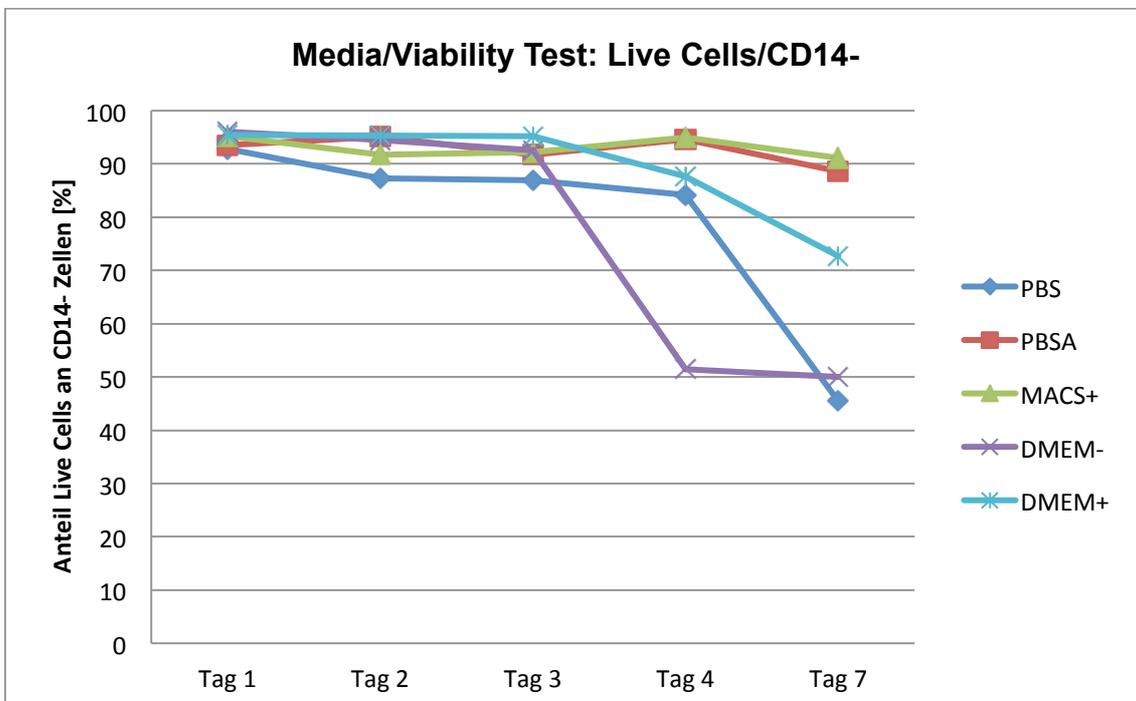


Abb. 4.18: Zellvitalität bezogen auf CD14-negative Zellen in unterschiedlichen Media

Gezeigt wird die absteigende Vitalität als Ergebnis des abnehmenden Anteils von Zellen im Gate live-cells an den CD14-neg. gateden Zellen (s. Abb. 4.15) für die unterschiedlichen Medien. Diese den Zielzellen für MRD-Messungen näher kommenden Zellen scheinen sich in PBSA und MACS⁺ am besten zu halten.

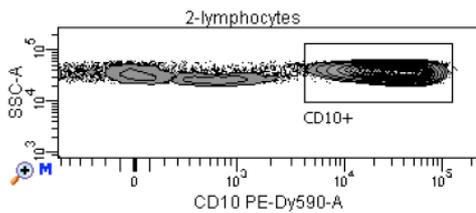
Der in Abb. 4.17 für alle Media erkennbare Einbruch der vitalen Zellen an Tag 2 ist am wahrscheinlichsten durch das Absterben von Granulozyten im Zeitfenster zwischen Tag 1 und Tag 2 erklärbar. Wir setzten die Lebend/Tot-Differenzierung mit Hilfe von AlexaFluor350 nach ihrer Entwicklung für die meisten nachfolgenden Färbungen ein. Der durch die zusätzlichen Waschschriffe verursachte Zellverlust war in den meisten Fällen vertretbar, nur in Einzelfällen, d.h. bei sehr wenig Ausgangsmaterial, führten wir den Schritt der AF350-Färbung nicht durch. Aufgrund der ordentlichen Ergebnisse mit AF350 reservierten wir diesen Kanal für die Lebend/Tot-Differenzierung nachfolgender Messungen mit Patientenproben am LSR II Durchflusszytometer.

4.2.2 Ergebnisse der Antikörper-Titrationsen

Für die Entwicklung eines neuen MRD-Backbone-Panels, d.h. einer definierten Kombination von Oberflächenmarkern, die wir neben variablen Leukämie-markern für unsere Tests einsetzten, war die Prüfung und Titration vieler unterschiedlich konjugierter Antikörper erforderlich. Bei insgesamt 28 Antikörper-Titrationsen überprüften wir die Eignung der einzelnen Antikörper für den beabsichtigten Einsatz als MRD-Marker hinsichtlich der bestmöglichen Auftrennung von für diesen Antikörper jeweils positiven und negativen Zellen. Gleichzeitig bestimmten wir eine minimale und maximale Verdünnung, sowie eine Verdünnungsempfehlung um optimale Ergebnisse zu erhalten.

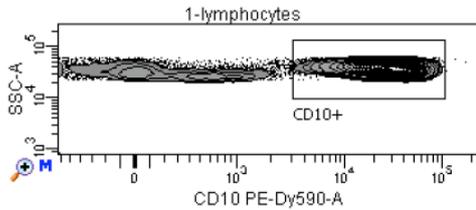
Exemplarisch soll nachfolgend bei dem ins Backbone-Panel übernommenen Tandem-Antikörper CD10-PE-Dye590 eine solche Titrationsreihe gezeigt werden. Wegen der Seltenheit von CD10-positiven Zellen in peripherem Spenderblut titrierten wir diesen Antikörper an KM-MNC einer c-ALL-ED in Konzentrationen von der 2-fachen Herstellerangabe bis zu 1/64 der Herstellerangabe. Wir führten zunächst ein FSC/SSC-gestütztes Gating auf Lymphozyten durch. Anschließend erfolgt die Auftragung der Zellen gegen CD10-PE-Dye590 und SSC-A (s. Abb. 4.19) und die Erfassung der CD10-positiven Zellen (Gates CD10+ in Abb. 4.19). Die Auswertung der Titration erfolgt mit Hilfe der medianen Expression von CD10 und dem Prozentsatz von jeweils CD10-positiven Zellen an den Lymphozyten (s. Statistiken in Abb. 4.19).

Ergebnisse



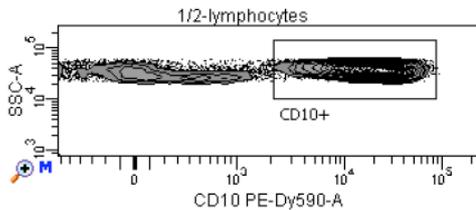
Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 2

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	32,547
lymphocytes	29,604	59.2	32,976
CD10+	26,400	89.2	36,225



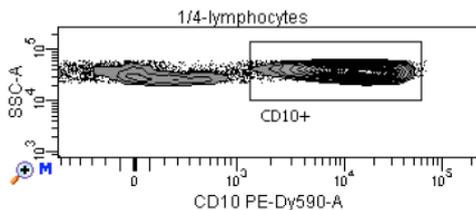
Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	26,375
lymphocytes	25,891	51.8	25,504
CD10+	22,116	85.4	29,432



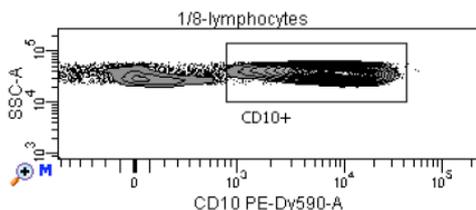
Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1/2

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	18,422
lymphocytes	26,497	53.0	17,985
CD10+	22,862	86.3	20,476



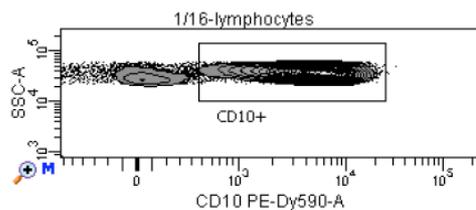
Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1/4

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	12,615
lymphocytes	28,749	57.5	12,582
CD10+	25,583	89.0	13,962



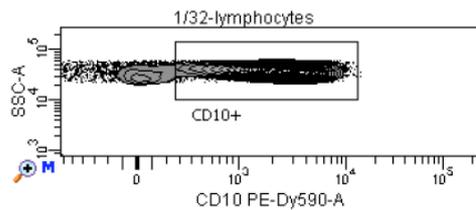
Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1/8

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	7,418
lymphocytes	30,497	61.0	7,650
CD10+	27,493	90.1	8,370



Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1/16

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	4,191
lymphocytes	32,303	64.6	4,558
CD10+	29,683	91.9	4,908



Specimen Name: CD10-PEDye590(Exbio)cloneG99J
Tube Name: 1/32

Population	#Events	%Parent	CD10 PE-Dy590-A Median
All Events	50,000	###	2,030
lymphocytes	32,817	65.6	2,232
CD10+	29,906	91.1	2,430

Ergebnisse

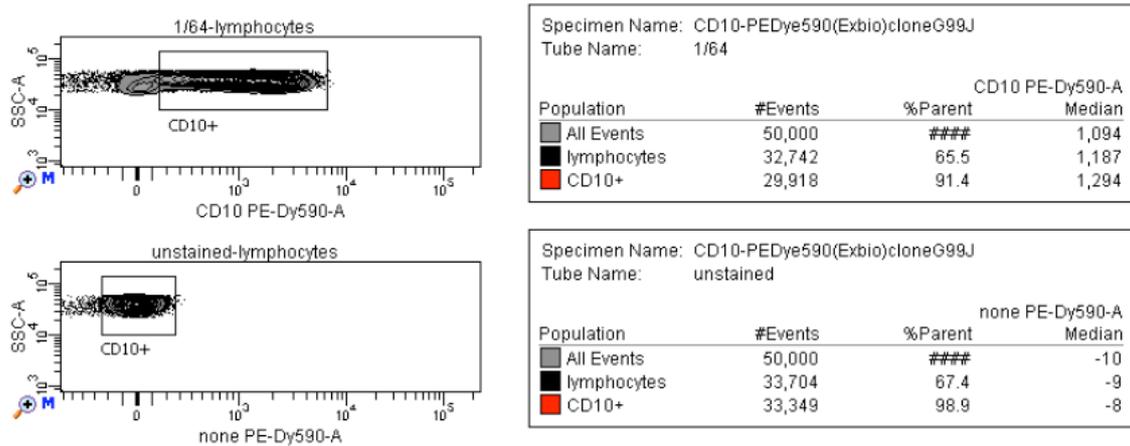


Abb. 4.19: Antikörper-Titration CD10-PE-Dye590

Dargestellt sind FACS-Analysen von mit CD10-PE-Dye590 gefärbten KM-MNC einer c-ALL-Erstdiagnose nach FSC/SSC-gestütztem Gating auf Lymphozyten (nicht abgebildet). Primär eingesetzt wurden je 500.000 Zellen, analysiert wurden je 50.000 Zellen. Die Ak-Konzentration ist als Vielfaches bzw. Bruchteil der vom Hersteller vorgegebenen Dosierung (20 µl Ak / 100 µl Zellsuspension) über den zugehörigen Dot Plots angegeben. Maßgeblich für das Ergebnis ist neben der medianen PE-Dye590 Signalstärke der CD10-positiven Zellen zur Bestimmung der optimalen Ak-Konzentration (s. jeweils zugehörige Statistik) auch die Trennung der CD10⁺-Zellen von unspezifisch angefärbten Zellen (unterhalb von 1/16 nicht mehr ausreichend) zur Prüfung der Eignung des Antikörpers als MRD-Marker. Für diesen Antikörper setzten wir einen Verdünnungsbereich von min. 1/8-fach bis max. 1-fach und eine Empfehlung von 1/3 der vom Hersteller empfohlenen Konzentration fest.

Die Mehrheit dieser Antikörpertitrations ließ sich allerdings mit peripherem Spenderblut derselben Person durchführen. In Ausnahmefällen war jedoch aufgrund der Seltenheit der jeweils gesuchten Zellen im peripheren Blut die Anfärbung von KM-MNCs erforderlich, wie auch im abgebildeten Beispiel gezeigt.

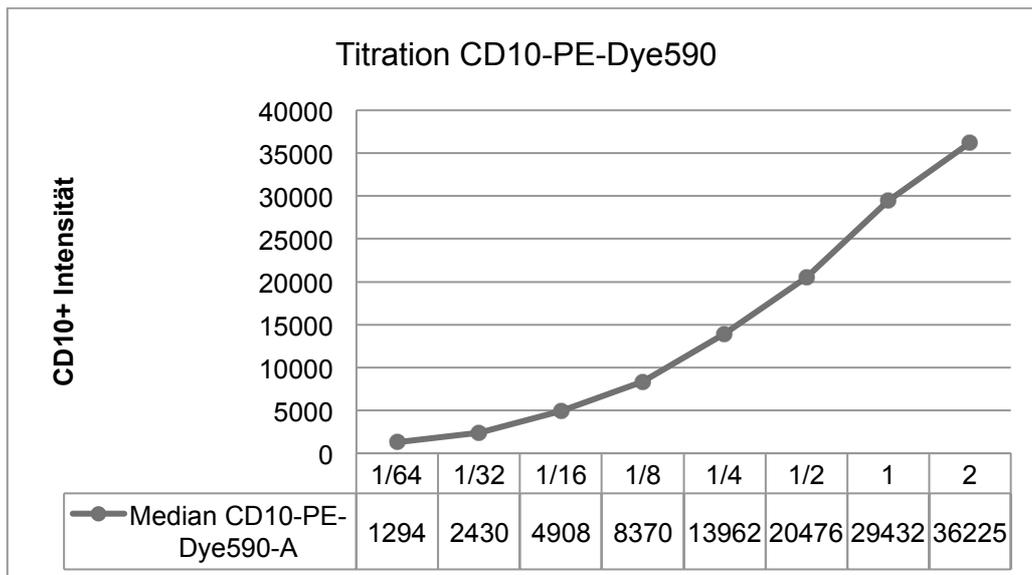


Abb. 4.20: Titrationskurve zu CD10-PE-Dye590

Ergebnisse

Aus Gründen der Übersicht folgen die Ergebnisse aller weiteren Antikörper-titrations tabellarisch:

Antikörper [CD]	Hersteller	Hersteller [µl/100µl]	Minimum [µl/100µl]	Maximum [µl/100µl]	Empfehlung [µl/100µl]
3-q605	Invitrogen	1	0,1	0,25	0,25
3-q655	Invitrogen	1	0,125	1	0,25
10-FITC	Dako	10	0,125	20	5
10-PB	Exbio	4	4	8	8
10-PE	Dako	5	0,625	10	2,5
10-PE-Dye590	Exbio	20	2,5	20	7
10-PerCP	Exbio	10	2,5	20	5
14-q800	Invitrogen	1	0,02	1	0,05
16-AF700	Exbio	4	2	8	4
19-APC	BD	5	1,25	5	2,5
19-APC-H7	BD	5	2,5	5	5
19-FITC	BD	20	5	20	10
19-PB	Exbio	4	1	4	2
34-APC	BD	5	1	4	2
34-FITC	BD	20	10	40	20
34-PE-Cy7	BD	5	2,5	10	4
34-PerCP	BD	20	5	40	15
38-FITC	Beckman C.	20	1,25	20	4
38-PB	Exbio	4	1	4	4
38-PE	BD	20	2,5	20	7
38-PE-Dye590	Exbio	20	5	20	10

Ergebnisse

38-PerCP	Exbio	10	5	10	10
45-AF700	Exbio	4	1	8	4
45-PB	Caltag	4	0,2	4	0,4
45-q800	Invitrogen	1	0,125	1	0,5
56-PE	Exbio	20	5	20	15
58-FITC	Beckman C.	20	1	20	10
58-PB	Exbio	4	1	4	2
58-PE	Exbio	20	10	40	20

Tab. 4.2: Ergebnisse der Antikörper-Titrationsen

Für die beiden folgenden Antikörper konnten wir in der Titrationskurve keine Sättigung und keine zufriedenstellende Trennung positiver Zellen von unspezifisch gefärbten Zellen erreichen und schlossen sie daher für weitere Experimente aus.

Antikörper	Hersteller	Klon
10-AlexaFluor 700	Exbio	MEM-78
58-AlexaFluor 700	Exbio	MEM-63

Tab. 4.3: Ausgeschlossene Antikörper

4.2.3 Entwicklung von Gating- und Auswertungsstrategien am LSR II

Bei der Bestimmung der Blastenpopulation waren die für eine verbesserte Auswertung der MRD notwendigen zusätzlichen Farben neben ihrem eigentlichen Einsatz als Leukämie-Marker und der Realisierung einer Lebend/Tot-Differenzierung, wie in Kap. 4.2.1 beschrieben, auch für den Ausschluss unerwünschter Zellen von großer Bedeutung.

Es galt, die benötigten Antikörper, die als neues Backbone-Panel bei allen Tests zukünftiger Messungen eingesetzt werden sollten, optimal auf die verschiedenen Kanäle zu verteilen. Dabei spielten mehrere Faktoren eine Rolle: Fluorochrome, deren Emissionsspektren sich zu großen Teilen mit Emissionsspektren benachbarter Kanäle überschneiden, eigneten sich lediglich für das „Herausgaten“ unerwünschter Zellen, ein Einsatz als MRD-Marker hätte wegen der für diese Farben hohen Kompensationswerte zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen können. Trotzdem musste auch in diesen Kanälen ein ausreichendes Signal für eben diese unerwünschten Zellen detektierbar sein und zudem auch noch in der bei der Titration der jeweiligen Antikörper definierten Verdünnung. Außerdem mussten noch genügend freie Kanäle für den Einsatz der wichtigsten Marker, nämlich der Leukämie-marker, verbleiben, wofür wir die am besten differenzierbaren Farben, für die auch möglichst viele konjugierte Antikörper existierten, reservierten. Wir untersuchten verschiedene Antikörper-Fluorochrom-Kombinationen mit unterschiedlichen Filtern, Spiegeln und Kompensationen für die geplante, feste Antikörperkombination (Backbone) und kamen zu folgendem Ergebnis:

Fluorochrom	Antikörper	Vorkommen
PE-Dye590	CD10	CALLA-Marker
PerCP	CD38	Häufiger Leukämiemarker / inverser Stammzellmarker (CD34+/CD38-)
PE-Cy7	CD34	Hämatopoetische Stammzellen
PB	CD45	Hämatopoetische Zellen/ häufiger Leukämiemarker
Qdot605	CD56	NK-Zellen
Qdot655	CD3	T-Zellen
Qdot800	CD14	Monozyten
APC-H7	CD19	B-Zellen
AlexaFluor700	CD16	NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen
AlexaFluor350	reactive dye	Lebend/Tot-Differenzierung

Tab. 4.4: 10-Farben-Backbone (LSR II)

Es verblieben die bewährten signalstarken Kanäle FITC, PE und APC neben einem weiteren Kanal für Qdot705/PE-AF700-Antikörper für maximal vier gleichzeitig einsetzbare MRD-Marker pro Röhrchen, statt wie bisher einem Kanal (FITC bzw. PE) am FACSCalibur Durchflusszytometer. Die nachfolgend erklärte Gating-Strategie auf Zellen der B-Zell-Linie wurde übernommen und als primäres Gating allen weiteren Tests vorangestellt. Alle weiteren Gating-Strategien werden bei der exemplarischen Auswertung von Patientenproben in Kap. 4.3 beschrieben.

Um also auf die für unsere Messungen relevanten Zellen der B-Zell-Linie zu gaten, wurden positive und negative Selektionen kombiniert: Zunächst wurden alle im Zeitfenster der Messung liegenden Zellen akquiriert und in einem FSC/SSC-Dot Plot ausgegeben (Abb. 4.21a), dort wurde zum weitestgehenden Ausschluss von Granulozyten auf mononukleäre Zellen gegatet und diese hinsichtlich ihrer Expression von CD14 analysiert (Abb. 4.21b). Um Monozyten herauszugaten, wurde in diesem Dot Plot auf CD14-negative Zellen gegatet.

Die verbliebenen Zellen wurden anschließend erneut in einen FSC/SSC-Dot Plot übertragen und von restlichen Zelltrümmern mit Hilfe des Gates „lymphoid cells“ in Abb. 4.21c getrennt. Danach wurden diese Zellen der oben beschriebenen Lebend/Tot-Differenzierung unterzogen (Abb. 4.21d). Im nächsten Dot Plot erfolgte die Auftragung der verbliebenen vitalen Zellen gegen CD16 und CD56, um durch Gating auf doppelt-negative Zellen weitere Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen auszuschließen (Abb. 4.21e). Bis zu diesem Schritt ging es insbesondere darum, vitale Lymphozyten herauszuselektionieren. Nun mussten diese Lymphozyten noch in B- und T-Lymphozyten getrennt werden. Dazu setzten wir die beiden letzten Kanäle des 10-Farben-Backbone ein und trennten durch Auswahl der CD19-positiven und gleichzeitig CD3-negativen Zellen B-Lymphozyten von T-Lymphozyten (Abb. 4.21f). Das Resultat dieser Gating-Strategie waren vorwiegend vitale Lymphozyten der B-Zell-Linie (Gate B lineage, Abb. 4.21f), die weitestgehend von Zelltrümmern, Monozyten und NK-Zellen aufgereinigt wurden und nun für die eigentliche Analyse und Quantifizierung relevant waren. Zur Kontrolle führten wir mit den gefundenen B-Zellen ein Backgating ins FSC/SSC-Fenster durch, bei dem sich eine gute unifokale Verteilung des Zellclusters im charakteristischen Bereich von Lymphozyten zeigte (Abb. 4.21g).

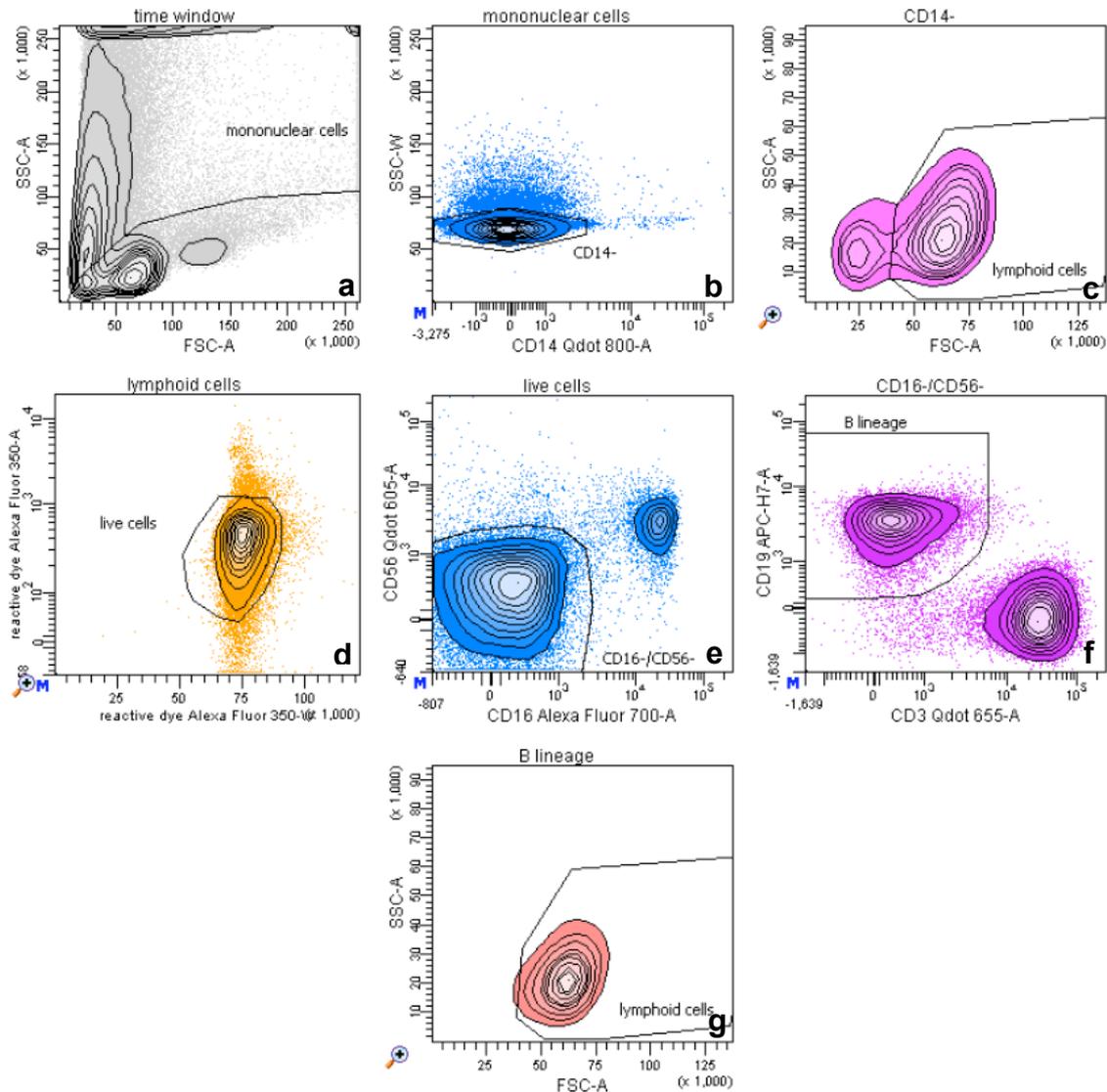


Abb. 4.21: Neue Gating-Strategie am LSR II am Beispiel einer B-ALL-MRD-Probe

Zunächst wird auf die zeitliche Achse der Datenakquisition gegatet (nicht abgebildet) und das Ergebnis im FSC/SSC angezeigt (time window, Abb. 4.21a). Dort wird ein Gate um mononukleäre Zellen gelegt (mononuclear cells, Abb. 4.21a), deren typische Lage im FSC/SSC bekannt ist, Granulozyten werden hier bereits größtenteils aufgrund ihrer hohen Granularität (SSC-Streulicht) ausgenommen. Anzeigen dieser Zellen im nächsten Dot Plot (Abb. 4.21b) und Gating auf CD14-negative Zellen (CD14-), dadurch weitgehende Eliminierung von Monozyten. In Abb. 4.21c erfolgt die erneute FSC/SSC-Darstellung und Gating auf lymphoide Zellen, deren Lage im Scatter-Dot Plot charakteristisch ist. Darauf Anzeige der verbleibenden Zellen und Gating auf lebende Zellen (live cells) mithilfe der oben gezeigten Lebend/Tot-Differenzierung (Abb. 4.21d). Die vitalen Zellen werden nachfolgend gegen CD16 und CD56 aufgetragen (Abb. 4.21e) um mittels des Gates CD16-/CD56- weitgehend NK-Zellen und Makrophagen auszunehmen. Die noch verbleibenden Zellen werden im CD3/CD19-Dot Plot (Abb. 4.21f) in B- und T-Zelllinie getrennt und die Zielzellen der B-ALL-Proben mit dem B-lineage Gate erfasst, abschließend Backgating zur Kontrolle der Lage der B-Zellen im FSC/SSC (Abb. 4.21g).

Zur genaueren Bestimmung des Anteils der Zellen mit aberrantem oder unter- bzw. überexprimierten Immunphänotyps musste analog wie in Kap. 3.4.1.2 beschrieben eine Korrekturrechnung erfolgen.

$$\text{Korrektur-Faktor} = \frac{1}{\%parent \text{ (live cells)} \times \%parent \text{ (lymphoid cells)}}$$

Dabei bedeutet „%parent (live cells)“ den prozentualen Anteil der vitalen Zellen unter den lymphoiden Zellen und „%parent (lymphoid cells)“ den prozentualen Anteil der lymphoiden Zellen unter den CD14-negativen, d.h. nicht monozytären Zellen, vergleiche oben gezeigte Gating-Strategie am LSR II (Abb. 4.21). Der Blastenanteil an der Gesamtzahl aller gemessenen Events wird auf diese Weise an die Gesamtzahl gemessener Zellen angepasst (Ausschluss von „debris“ und Dubletten). Die Anwendung der korrigierten MRD-Berechnung wird im folgenden Kapitel 4.3 an Patientenproben veranschaulicht.

4.2.4 Zusammenfassung des Kapitels

Für den Transfer der MRD-Analyse auf das neu angeschaffte 14-Farben-Durchflusszytometer LSR II war zunächst die technische Aufrüstung des Geräts um einen weiteren Laser und neue Detektoren erforderlich. Danach entwickelten wir eine Lebend/Tot-Differenzierung mit Hilfe reaktiver Farbstoffe, um die MRD-Messungen auf die Analyse vitaler Zellen fokussieren zu können. Von den acht getesteten Dyes erzielten wir mit AlexaFluor350 die deutlichsten Ergebnisse. Darüberhinaus testeten wir unterschiedliche Media zur Aufbewahrung der Zellen während den Färbeschritten, wobei sich bei proteinhaltigen Media wie PBSA, MACS-Puffer oder DMEM⁺ ein geringerer Zellverlust zeigte. Zur Etablierung des neuen 10-Farben-Backbone-Panels, das in den nachfolgenden Messungen in fester Kombination eingesetzt werden sollte, titrierten wir insgesamt 28 Antikörper und fanden eine geeignete Verteilung der Antikörper auf die einzelnen Kanäle unter Freihaltung der technisch besten Kanäle für die individuellen MRD-Marker. Zuletzt optimierten wir die Gating-Strategien für eine qualitativ gründlichere MRD-Analyse von B-Zell-Leukämien durch den Einsatz von sechs Kanälen (zusätzlich zum FSC und SSC) für die Vorauswahl von Zellen der B-Zell-Linie gegenüber lediglich einem Kanal (CD19-APC zusätzlich zum FSC/SSC) am bisherigen 4-Farben-Durchflusszytometer.

4.3 Einzelmessungen von B-ALLs im Vergleich

Die Ergebnisse unserer Experimente zur Übertragung der am FACSCalibur etablierten Methode der Bestimmung der minimalen Resterkrankung auf das neue Durchflusszytometer LSR II sollen in diesem Kapitel unter Ausnutzung der neu entstandenen Möglichkeiten an zwei B-ALL-Patienten exemplarisch gezeigt werden. Nachdem das methodische Vorgehen sowie neue Gating-Strategien durch die intensiven Vorarbeiten definiert wurden, untersuchten wir für beide Patienten kryokonservierte KM-MNC vom Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie jeweils zwei kryokonservierte MRD-Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten. Mithilfe des neu etablierten Vorgehens konnten wir bei beiden Patienten die deutlichen Blastenpopulationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose identifizieren und geeignete MRD-Marker festlegen. Mittels dieser MRD-Marker war eine Bestimmung der minimalen Resterkrankung zu den je zwei Zeitpunkten der Follow-Up-Proben an sehr viel weniger Material möglich als bei vergleichbaren Messungen am FACSCalibur.

4.3.1 Patientin 1

4.3.1.1 Patientin 1: Klinische Situation

Eine Patientin erkrankt im Alter von zwei Jahren an einer c-ALL (common ALL). Eine erste Therapie im Ausland zeigt nach acht Tagen einen deutlichen Rückgang der im peripheren Blut nachweisbaren Blasten (Prednison-Good-Responder), allerdings sind im Knochenmark noch ausreichend Leukämiezellen für die Festlegung der MRD-Marker nachweisbar. Die Patientin wird in Tübingen weiterbehandelt. Eine Meningeosis ist nicht beurteilbar, keine Gen-Rearrangements, Standardrisikogruppe. Untersucht werden kryokonservierte KM-MNC der (anbehandelten) Erstdiagnose und von zwei nachfolgenden Punktionen an Tag 15 und Tag 126 nach Ersterkrankung.

4.3.1.2 Patientin 1: Erstdiagnose

Nach Auftauen (siehe Kap. 3.2.4) der Zellen und einem primären Gating auf Zellen der B-Zell-Linie wie oben erklärt (siehe Abb. 4.21), erfolgt die weitere Auswertung der Erstdiagnose. Aus Gründen der Übersicht wird das bereits beschriebene primäre Gating nicht mit abgebildet. Aus 5×10^6 kryokonservierten Zellen resultierten $1,7 \times 10^6$ Zellen für die Färbung der Erstdiagnose. Wir setzten $0,2 \times 10^6$ Zellen in insgesamt 7 Tests für Leukämie-Marker ein. In der nachfolgenden Abbildung werden exprimierte Marker bei der Patientin identifiziert, dazu werden die bei ED CD34-negativen und CD10-positiven Zellen (typische CD10-Überexpression bei c-ALLA, siehe Abb. 4.22a, Gate ED 34-/10+) in Dot Plots mit jeweils zwei möglichen CD-Markern übertragen (Abb. 4.22b-i); die Position der Zellpopulation mit Gates festgehalten (Abb. 4.22b-i, Gates ED P1-P8) und die exprimierten Marker notiert.

Die erste Analyse der Erstdiagnose ergibt aufgrund des jeweiligen Signals als potentielle MRD-Marker:

- CD66c (ED P1, s. Abb. 4.22b)
- CD58 (ED P1, s. Abb. 4.22b), Überexpression
- CD45 (ED P2, s. Abb. 4.22c), Unterexpression
- CD38 (ED P3, s. Abb. 4.22d), Unterexpression
- CD135 (ED P4, s. Abb. 4.22e)

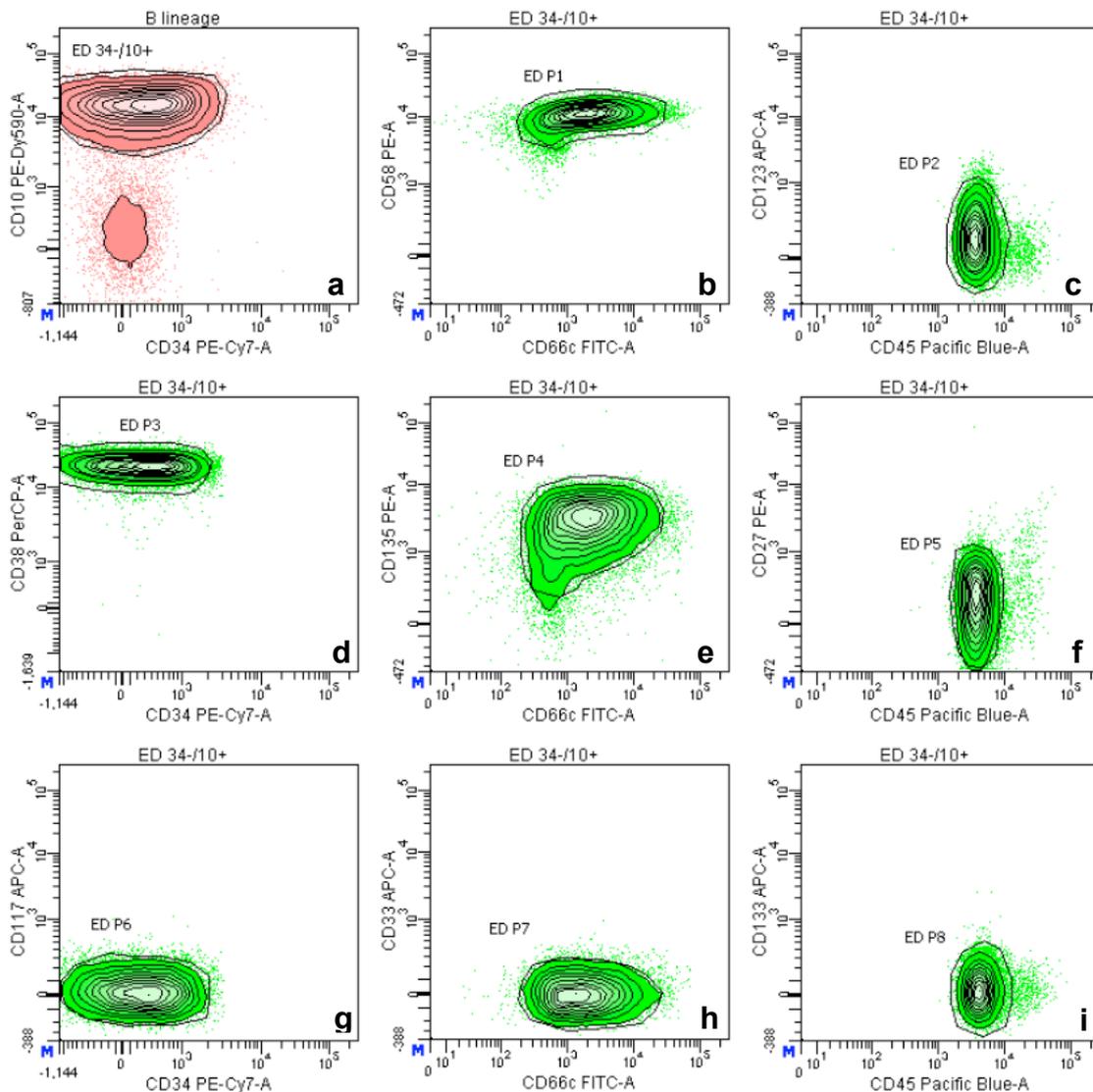


Abb. 4.22: Erstdiagnose Patientin 1 – exprimierte Marker (1/2)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (a) angezeigt. Es zeigt sich die für c-ALLA typische hohe Expression von CD10, weiterhin stellt sich die Blastenpopulation CD34-negativ dar, es folgt also Gating auf CD34⁻/CD10⁺-Zellen (Abb. a, Gate ED 34-/10+). Die Zellen dieses Gates stellen potentielle Blasten dar und werden in allen folgenden Dot Plots (b-i) auf ihre Expression möglicher MRD-Marker überprüft. Dazu wird um jede Population ein Gate gelegt (ED P1 bis ED P8), das in der nächsten Abbildung mit physiologischem KM verglichen wird.

Diese Marker werden nun auf ihre Eignung, die Leukämie zukünftig im Sinne der MRD-Bestimmung zu verfolgen, geprüft, indem diese ED-Gates in Dot Plots mit Datensätzen gesunder bzw. regenerierender KM-Proben kopiert werden, um in dieser Ansicht die Follow-Up-Marker festzulegen (Abb. 4.23). Tritt nur eine geringe Abweichung der ED-Gates gegenüber analog gefärbten Zellen von physiologischen KM-Proben auf, so eignet sich der jeweilige Marker nicht als MRD-Marker. Ist die Abweichung deutlich größer, so kommen diese Marker für

die Nachverfolgung der Leukämie in Betracht. Für diese Patientin ergeben sich CD66c und CD135 als zukünftige MRD-Marker, da sich für diese Marker die größte Abweichung gegenüber den Kontrollen zeigten (Abb. 4.23b/e). Allerdings sind auch die beiden gewählten Marker CD66c und CD135 nicht in der Lage, eine komplette Auftrennung von physiologischen Populationen zu ermöglichen.

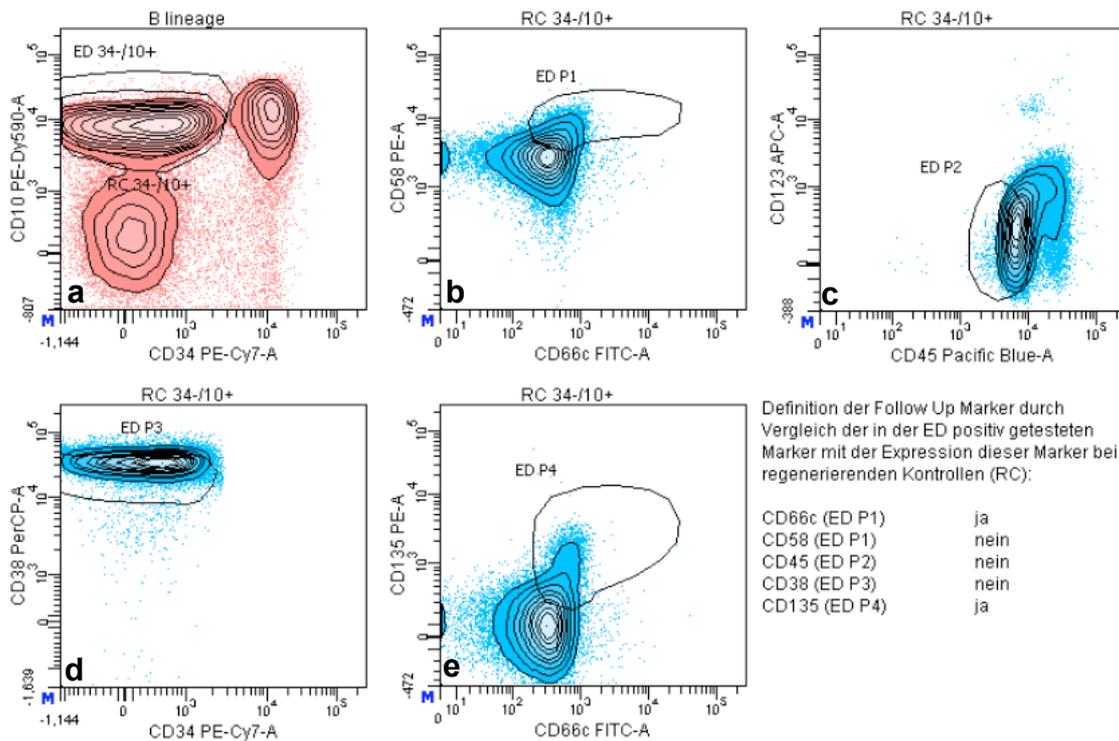


Abb. 4.23: Erstdiagnose Patientin 1 – Abgleich mit physiologischem KM (2/2)

Für die Entscheidung welche der oben positiv getesteten möglichen MRD-Marker ins Follow-Up aufgenommen werden erfolgt in dieser Abbildung zunächst ein primäres Gating auf B-lineage Zellen physiologischer KM Proben (s. Abb. 4.21) und im B-lineage Dot Plot die Auswahl CD34⁺/CD10⁺-Zellen (a, Gate RC34-/10+). Diese physiologischen Zellen werden zusammen mit den Gates der in der ED positiven Marker in zur ED analogen Dot Plots dargestellt (b-e). Für drei der fünf potentiellen Marker zeigt sich eine große Überlappung mit physiologischem KM, sie sind als Leukämie-Marker untauglich (CD58, CD45 und CD38). CD 66c (b/e) und CD135 (e) dagegen zeigen sich in der ED deutlich stärker exprimiert als bei physiologischem KM, sie werden als MRD-Follow-Up-Marker festgelegt.

4.3.1.3 Patientin 1: MRD Tag 15

Aus insgesamt $8,6 \times 10^6$ kryokonservierten Zellen von Tag 15 resultierte eine Zellzahl von $2,21 \times 10^6$ Zellen. Wir färbten diese Probe mit den für die Patientin bei der Erstdiagnose festgelegten MRD-Markern CD66c und CD135. Nach be-

kanntem Gating auf B-lineage-Zellen (s. Abb. 4.21) folgt die weitere Auswertung.

Dazu werden die Zellen gegen CD34 und CD10 aufgetragen. In diesem Dot Plot wird auf die CD34⁻/CD10⁺-Zellen gateget (Abb. 4.24a), da die Blasten zum Zeitpunkt der ED diese Expression zeigten (s. Abb. 4.22), und die verbliebenen Zellen, d.h. potentielle Blasten, in Abb. 4.24b gegenüber den gefundenen MRD-Markern CD66c und CD135 aufgetragen. Als Kontrolle werden Zellen von regenerativen KM-Proben denselben Färbungen und Gating-Strategien unterzogen, das Ergebnis dieser Kontrolle zeigt Abb. 4.24c. Um die potentiellen Blasten in Abb. 4.24b nun der leukämischen Blastenpopulation oder aber physiologischen Zellen zuzuordnen, wurde in Abb. 4.24c ein Gate um die physiologischen Zellen gelegt (RC 66c/135 (CD34-)) und in die Auswertung der Patientenprobe übertragen (Abb. 4.24b). Es zeigte sich, dass viele potentielle Blasten in dem Gate der regenerativen Kontrolle zu liegen kommen, die darüberhinausgehenden Zellen werden schließlich mit dem Gate MRD 66c/135 (34-) in Abb. 4.24b erfasst und nachfolgend in der Populations-Statistik quantifiziert.

Zur Kontrolle wird ein Backgating der gefundenen CD10-positiven Zellen in den AF350-Dot Plot (Vitalitätskontrolle, Abb. 4.24d), sowie ein Backgating der Blasten in ein FSC/SSC-Dot Plot (Position im Lymphozytengate, Abb. 4.24e) durchgeführt.

Ergebnisse

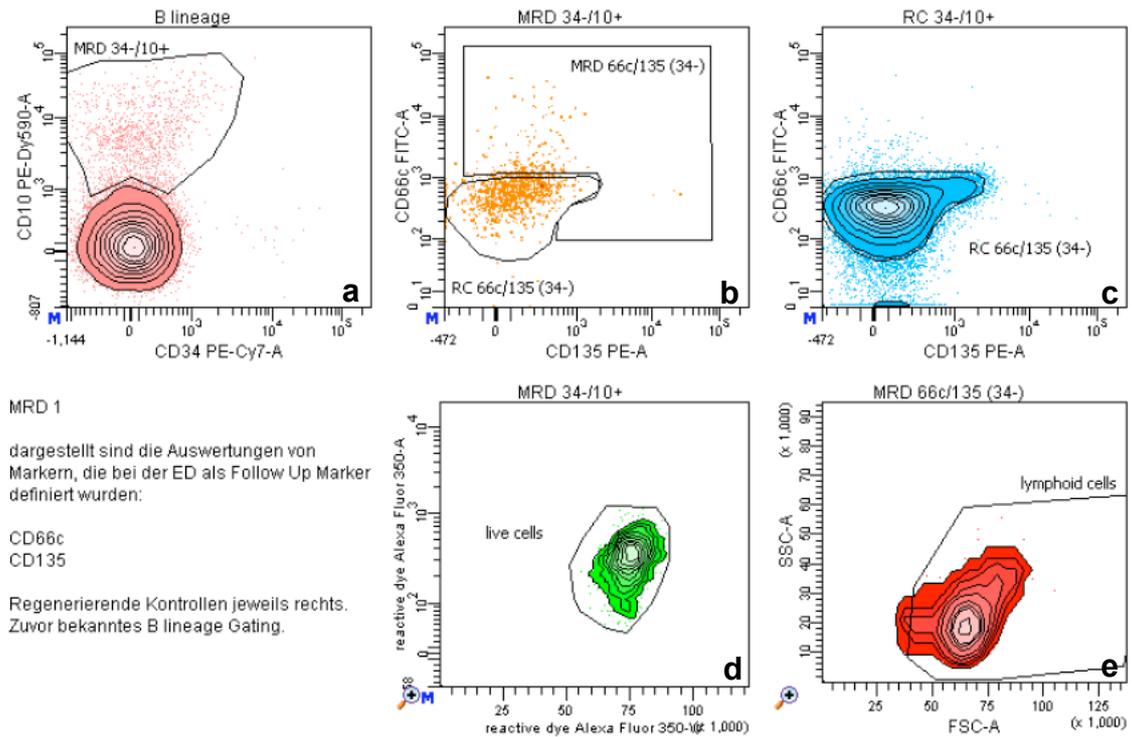


Abb. 4.24: Erste MRD-Kontrolle Patientin 1 (1/2)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (a) analysiert. Es zeigen sich immer noch CD34/CD10⁺-Zellen wie bei der ED, auf die mit dem Gate MRD 34-/10+ gegatet wird (a). Es folgt die Darstellung dieser Zellen in einem gemeinsamen Dot Plot für die festgelegten MRD-Marker CD66c und CD135 (b). Rechts werden analog dazu CD34/10⁺-Zellen aus physiologischen KM-Proben dargestellt und mit dem Gate RC 66c/135 (34-) der Bereich definiert, in dem sich gesunde bzw. regenerierende KM-Zellen in einem MRD-analogen CD66c/CD135-Dot Plot befinden (c). Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert und mit dem Gate MRD 66c/135 (34-) die eigentlichen verbleibenden Blasten erfasst. Zur Kontrolle Backgating der CD10⁺-Zellen in den AF350 Dot Plot (d) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten.

Tube: MRD1_66c_135_10_38_34_45_56_14_LD_3_33_16_19

Population	#Events	%Parent	%Total
all events	156,516	###	100.0
time window	156,505	100.0	100.0
mononuclear cells	75,834	48.5	48.5
CD14-	70,574	93.1	45.1
lymphoid cells	56,576	80.2	36.1
live cells	53,566	94.7	34.2
CD16-/CD56-	47,494	88.7	30.3
B lineage	19,787	41.7	12.6
MRD 34-/10+	1,075	5.4	0.7
RC 66c/135 (34-)	789	73.4	0.5
MRD 66c/135 (34-)	167	15.5	0.1

Abb. 4.25: Erste MRD-Kontrolle Patientin 1 (2/2)

Darstellung der Populations-Hierarchie mit absoluten Zahlen und relativen Anteilen der jeweiligen Subpopulationen

Für die Auswertung (vgl. Abb. 4.25 und Korrekturrechnung wie in Kap. 4.2.3 beschrieben) ergab sich ein Anteil von CD66c/CD135-positiven Blasten an der Gesamtzahl der lymphoiden Zellen von:

$$\frac{1}{0,947 (\%p. \text{ live cells}) \times 0,802 (\%p. \text{ lymphoid cells})} \times \frac{167 (\text{MRD } 66c/135 (34-))}{156505 (\text{time window})} \times 100$$

= 0,14 %

Die Messung dieser MRD erfolgte am Tag des Probeneingangs auch am FACSCalibur mit frischen Zellen. In die Auswertung ging wegen geringer Zellzahl und Nichtverfügbarkeit von CD135 lediglich CD66c als MRD-Marker ein. Für CD66c ergab sich an diesem Gerät ein leicht erhöhter Blastenanteil von 0,17 %, was möglicherweise durch Mitkalkulation von „debris“, Dubletten, toten Zellen oder falsch-positiven Zellen bedingt sein kann.

4.3.1.4 Patientin 1: MRD Woche 12

Für die zweite MRD-Messung dieser Patientin in Woche 12 (Beginn Protokoll M) resultierte eine Zellzahl von $1,72 \times 10^6$ Zellen aus ursprünglich $17,2 \times 10^6$ kryokonservierten Zellen. In diesem Fall profitierten wir bereits von der neuen Möglichkeit am LSR II mehrere statt wie beim FACSCalibur nur einzelne MRD-Marker im selben Teströhrchen untersuchen zu können. So färbten wir diese Probe mit den für die Patientin festgelegten MRD-Markern CD66c und CD135 analog zur ersten MRD-Probe (s. Kap. 4.3.1.3).

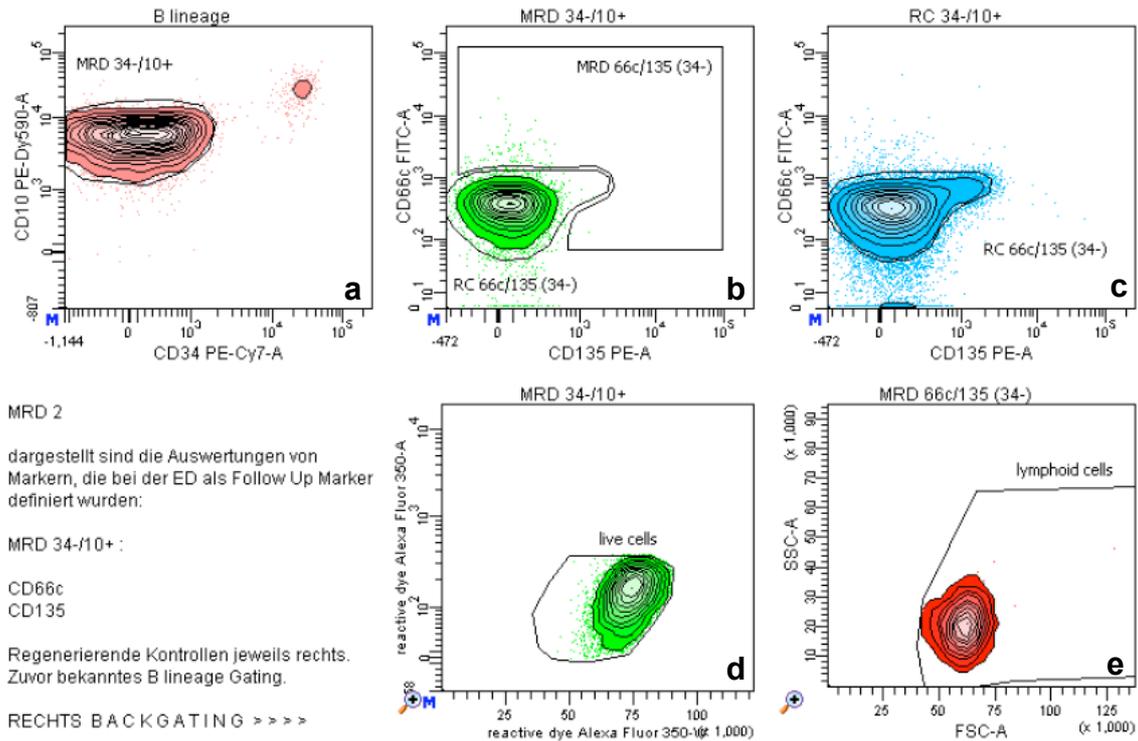


Abb. 4.26: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (1/3)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (a) analysiert. Es zeigen sich neben noch CD34⁺/CD10⁺-Zellen wie bei der ED, auf die mit dem Gate MRD 34-/10+ gegatet wird, noch CD34⁺/CD10⁺-Zellen, deren Auswertung in der folgenden Abb. 4.27 fortgeführt wird. Es folgt die Darstellung der Zellen im Gate „MRD 34-/10+“ in einem gemeinsamen Dot Plot für die festgelegten MRD-Marker CD66c und CD135 (b). Rechts werden analog dazu CD34⁺/CD10⁺-Zellen aus physiologischen KM-Proben dargestellt und mit dem Gate RC 66c/135 (34-) der Bereich definiert, in dem sich gesunde bzw. regenerierende KM-Zellen in einem MRD-analogen CD66c/CD135-Dot Plot befinden (c). Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert und mit dem Gate MRD 66c/135 (34-) die eigentlichen verbleibenden Blasten erfasst. Zur Kontrolle Backgating der CD10⁺-Zellen in den AF350 Dot Plot (d) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten.

Wie auch bei der ersten MRD-Probe dieser Patientin stellte sich hier der Hauptteil der potentiellen Blasten auf den ersten Blick im Bereich der regeneratori- schen Kontrolle dar (s. Abb. 4.26b). Bei dieser Probe zeigten sich nach primä- rem B-lineage-Gating neben den CD34-negativen potentiellen Blasten nun auch CD34-positive Zellen, die näher untersucht werden mussten. Analog zur Aus- wertung der CD34⁺/CD10⁺-Zellen bedeutete dies wiederum die Durchführung derselben Färbungen und Gating-Strategien für Kontroll-KM bis zu diesem Schritt. Das Ergebnis für CD10⁺/CD34⁺-doppelpositive Zellen aus physiologi- schen KM zeigt Abb. 4.27c. Diese Position dieser Zellen wurde mit dem Gate RC 66c/135 (34+) definiert und in Abb. 4.27b übertragen. Dies ermöglichte auch für diesen Zweig der Auswertung die Abgrenzung von leukämischen Blas- ten von regeneratorischen KM-Zellen. Für die abschließende Blastenquantifizie-

ung mussten die gefundenen Blasten aus beiden Zweigen der Auswertungen, d.h. $CD10^+/CD34^-$ und $CD10^+/CD34^+$ addiert werden.

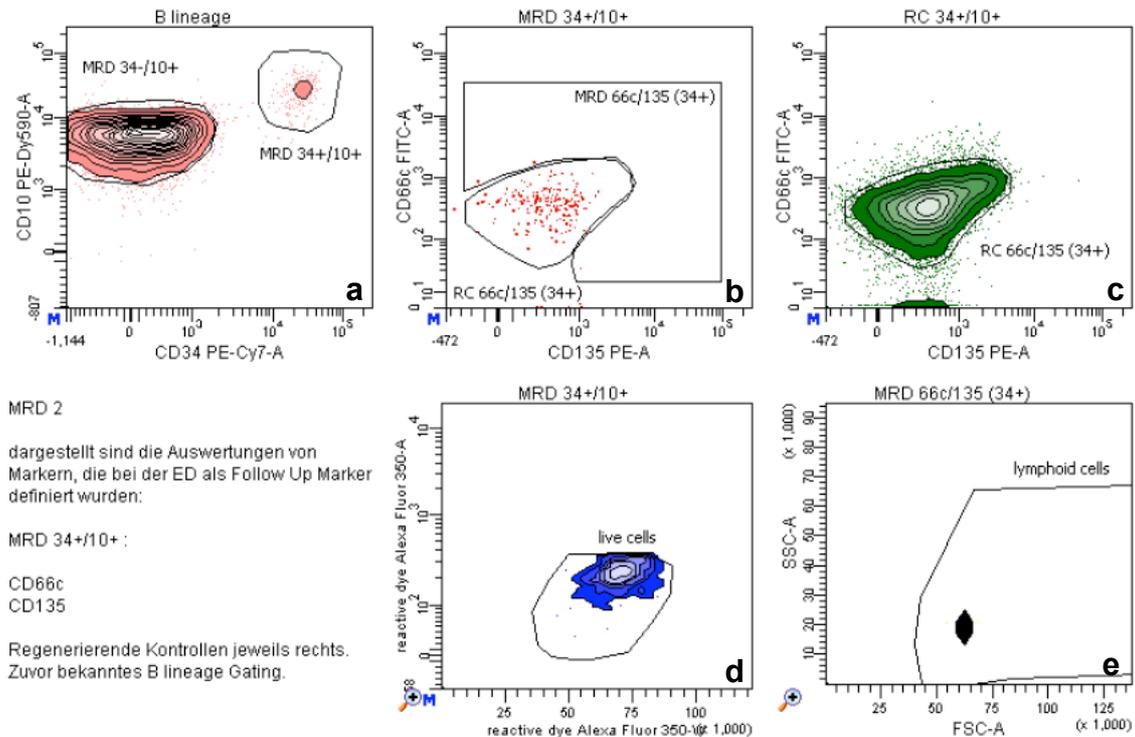


Abb. 4.27: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (2/3)

Neben den in der vorigen Abbildung analysierten $CD34^+/CD10^-$ -Zellen wird im Dot Plot (a) nun auf die neu aufgetauchten $CD34^+/CD10^+$ -Zellen gegatet (Gate MRD 34+/10+). Als Kontrolle werden in Abbildung (c) $CD34^+/CD10^+$ -Zellen nach vorigem Gating auf B-lineage-Zellen (s. Abb. 4.21) von physiologischen KM-Proben in einem zur MRD-Situation-analogen CD66c/CD135-Dot Plot aufgetragen und mit dem Gate RC 66c/135 (34+) markiert. Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert, wo die $CD34^+/CD10^+$ -Zellen der MRD-Probe angezeigt werden. Es wird deutlich, dass sich diese Zellen fast vollständig im Gate der physiologischen Kontrollen befinden. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellen nicht um leukämische Blasten sondern vielmehr um regenerierende KM-Zellen der Patientin handelt. Zur Kontrolle Backgating der $CD10^+$ -Zellen in den AF350 Dot Plot (d) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten.

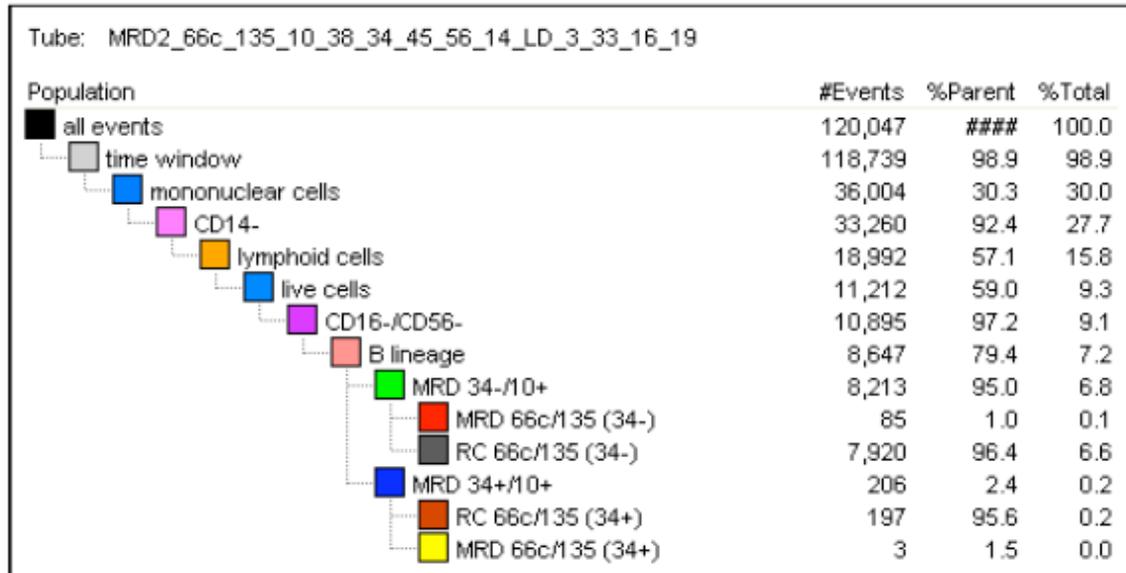


Abb. 4.28: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (3/3)

Darstellung der Populations-Hierarchie mit absoluten Zahlen und relativen Anteilen der jeweiligen Subpopulationen

Für die Auswertung (vgl. Abb. 4.28 und Korrekturrechnung wie in Kap. 4.2.3 beschrieben) ergab sich ein Anteil von CD66c/CD135-positiven Blasten an der Gesamtzahl der lymphoiden Zellen von:

$$\frac{1}{0,59 (\%p. \text{ live cells}) \times 0,571 (\%p. \text{ lymphoid cells})} \times \frac{85 (\text{MRD } 66c/135 (34-)) + 3 (\text{MRD } 66c/135 (34+))}{118739 (\text{time window})} \times 100$$

= 0,22 %

Die Messung dieser MRD erfolgte am Tag des Probeneingangs auch am FACSCalibur mit frischen Zellen. In die Auswertung ging wegen geringer Zellzahl und Nichtverfügbarkeit von CD135 lediglich CD66c als MRD-Marker ein. Für CD66c ergab sich an diesem Gerät ein leicht niedrigerer Blastenanteil von 0,13 %, möglicherweise bedingt durch eine erhöhte Zahl falsch CD66c-positiver Zellen oder eines gegenteiligen Effekts durch die Kryokonservierung der am LSR II gemessenen Probe.

4.3.2 Patient 2

4.3.2.1 Klinische Situation

Ein Patient erkrankt im Alter von 14 Jahren an einer c-ALL (common ALL). Keine Meningeosis, keine Gen-Rearrangements, Prednison-Good-Responder. Nach zunächst gutem Therapieansprechen erleidet der Patient im Alter von 17 Jahren ein akutes Rezidiv. Untersucht werden kryokonservierte KM-MNC der Erstdiagnose des akuten Rezidivs und von zwei nachfolgenden Punktionen an Tag 19 und Tag 106 nach Erkrankung am Rezidiv.

4.3.2.2 Patient 2: Erstdiagnose

Aus 20×10^6 kryokonservierten Zellen resultierten $7,31 \times 10^6$ Zellen für die Färbung der Erstdiagnose (akutes Rezidiv). Wir setzten $0,5 \times 10^6$ Zellen in insgesamt 5 Tests für Leukämie-Marker ein. Nach Auftauen (siehe Kap. 3.2.4) der Zellen und einem primären Gating auf Zellen der B-Zell-Linie wie oben erklärt (siehe Abb. 4.21) erfolgte die weitere Auswertung der Erstdiagnose analog wie für Patientin 1 beschrieben. Aus Gründen der Übersicht wird das primäre Gating nicht mit abgebildet. In der nachfolgenden Abbildung werden exprimierte Marker beim Patient identifiziert, dazu werden die bei ED CD34-positiven und CD10-positiven Zellen (typische CD10-Überexpression bei c-ALLA, siehe Abb. 4.29a, Gate ED 34+/10+) in Dot Plots mit jeweils zwei möglichen CD-Markern übertragen (Abb. 4.29b-i), die Position der Zellpopulation mit Gates festgehalten (Abb. 4.29b-i, Gates ED P1-P8) und die exprimierten Marker notiert.

Die erste Analyse der Erstdiagnose ergibt aufgrund des jeweiligen Signals als potentielle MRD-Marker:

- CD66c (ED P1, s. Abb. 4.29b)
- CD58 (ED P1, s. Abb. 4.29b), Überexpression
- CD45 (ED P2, s. Abb. 4.29c), Unterexpression
- CD123 (ED P2, s. Abb. 4.29c)
- CD38 (ED P3, s. Abb. 4.29d), Unterexpression
- CD135 (ED P7, s. Abb. 4.29h)

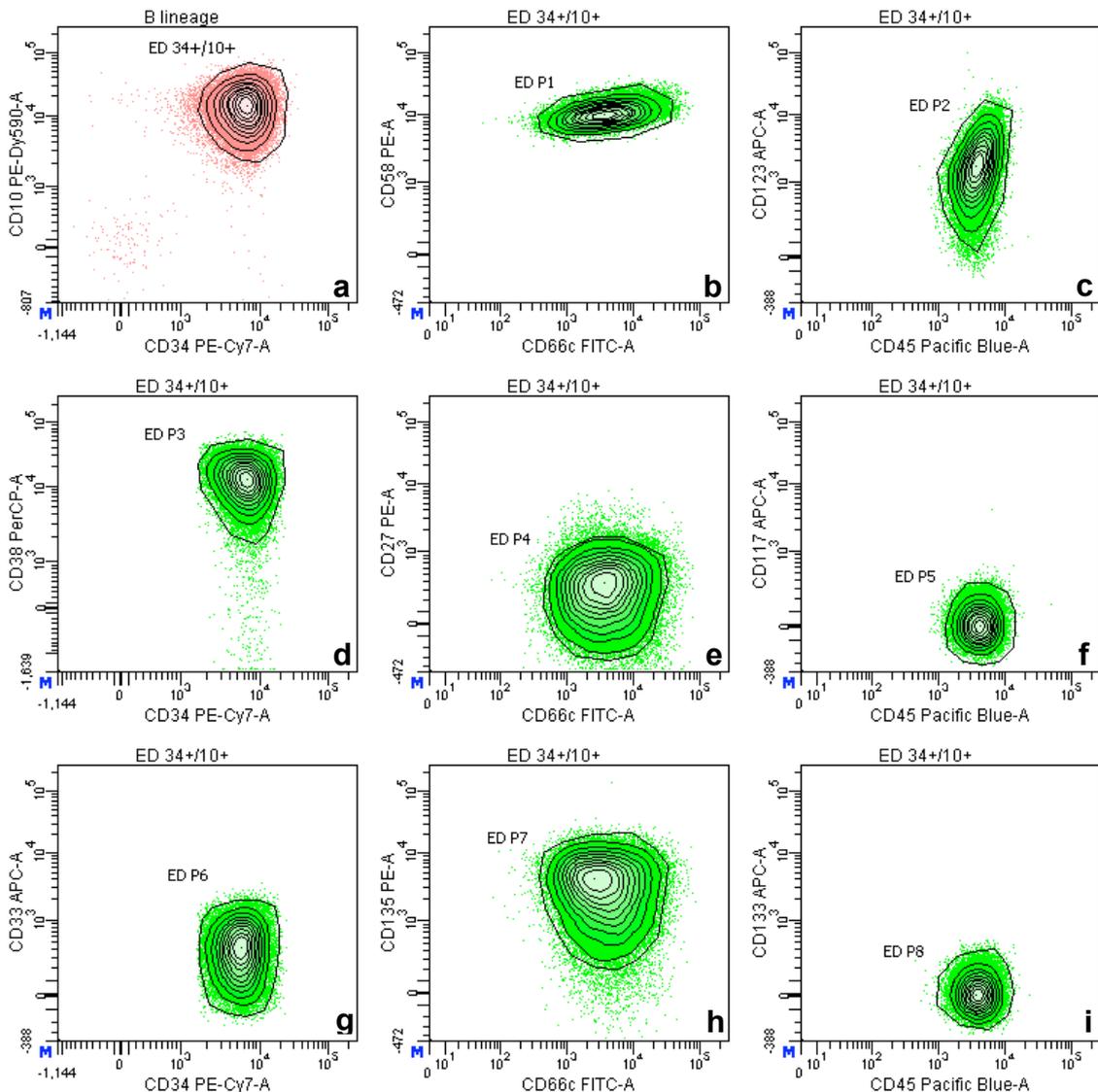


Abb. 4.29: Erstdiagnose Patient 2 – exprimierte Marker (1/2)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (a) angezeigt. Es zeigt sich die für c-ALL typische hohe Expression von CD10, weiterhin stellt sich die Blastenpopulation CD34-positiv dar, es folgt also Gating auf CD34⁺/CD10⁻-Zellen (Abb. a, Gate ED 34+/10+). Die Zellen dieses Gates stellen potentielle Blasten dar und werden in allen folgenden Dot Plots (b-i) auf ihre Expression möglicher MRD-Marker überprüft. Dazu wird um jede Population ein Gate gelegt (ED P1 bis ED P8), das in der nächsten Abbildung mit physiologischem KM verglichen wird.

Diese Marker werden nun auf ihre Eignung, die Leukämie zukünftig im Sinne der MRD-Bestimmung zu verfolgen geprüft, indem diese ED-Gates in Dot Plots mit Datensätzen der gesunden bzw. regenerierenden KM-Proben kopiert werden, um in dieser Ansicht die Follow-Up-Marker festzulegen (s. Abb. 4.30). Tritt nur eine geringe Abweichung der ED-Gates gegenüber analog gefärbten Zellen von physiologischen KM-Proben auf, so eignet sich der jeweilige Marker nicht als MRD-Marker. Ist die Abweichung deutlich größer, so kommen diese Marker

für die Nachverfolgung der Leukämie in Betracht. Für diesen Patient ergeben sich CD66c und CD123 als zukünftige MRD-Marker, da sich für diese Marker die größte Abweichung gegenüber den Kontrollen zeigten (Abb. 4.30b/c/e). In der Abbildung wurde wie zuvor beschrieben primär auf B-Zellen der physiologischen KM-Probe gated (s. Abb. 4.21).

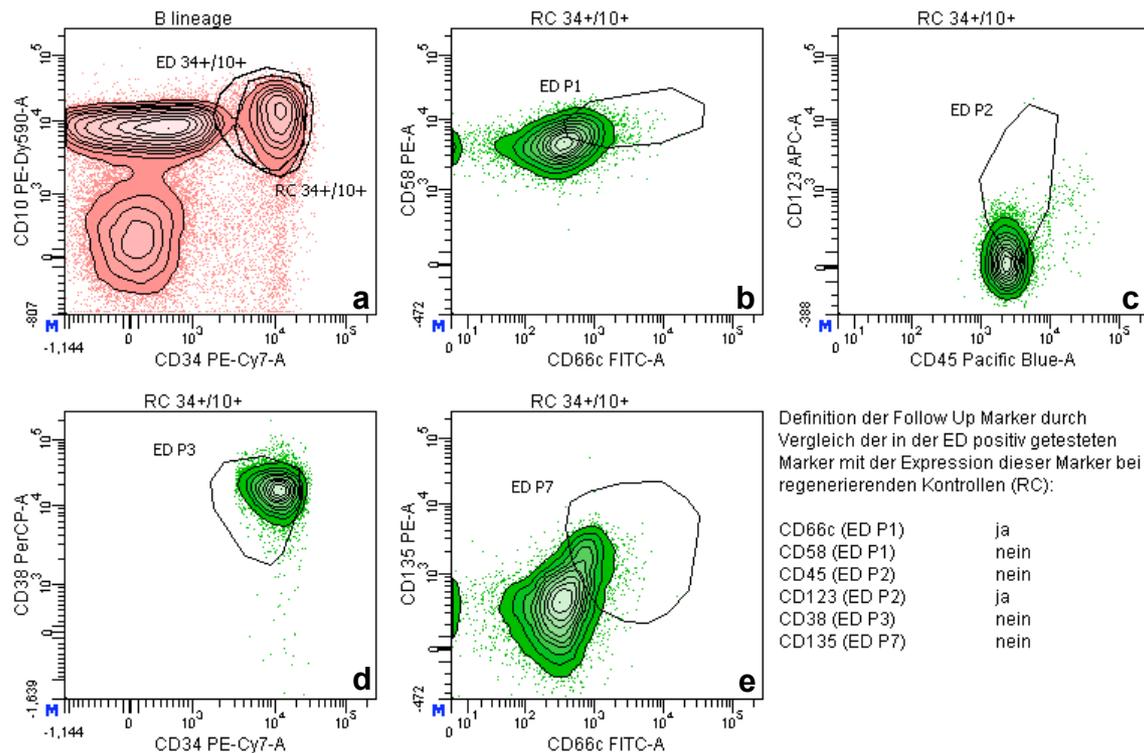


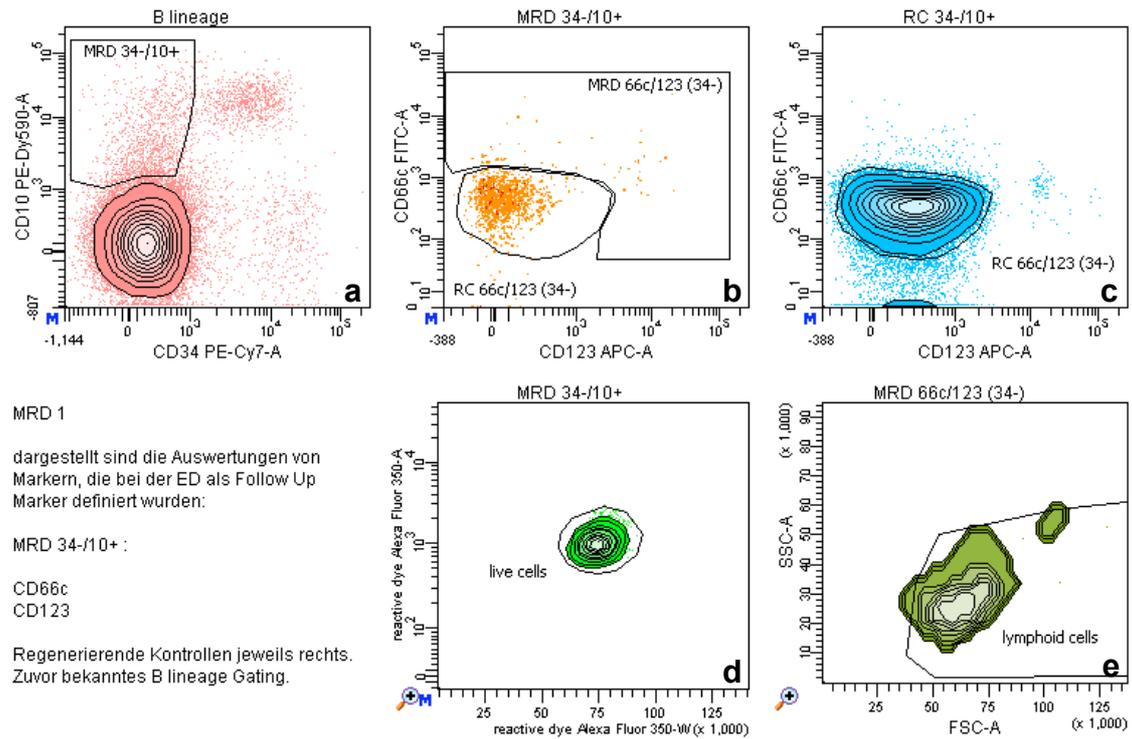
Abb. 4.30: Erstdiagnose Patient 2 – Abgleich mit physiologischem KM (2/2)

Für die Entscheidung welche der oben positiv getesteten möglichen MRD-Marker ins Follow-Up aufgenommen werden erfolgt in dieser Abbildung zunächst ein primäres Gating auf B-lineage-Zellen physiologischer KM-Proben (s. Abb. 4.21) und im B-lineage-Dot Plot die Auswahl CD34⁺/CD10⁺-Zellen (a, Gate RC 34+/10+). Diese physiologischen Zellen werden zusammen mit den Gates der in der ED positiven Marker in zur ED analogen Dot Plots dargestellt (b-e). Für vier der sechs potentiellen Marker zeigt sich eine große Überlappung mit physiologischem KM, sie sind als Leukämie-Marker untauglich. CD66c (b/e) und CD123 (c) dagegen zeigen sich in der ED deutlich stärker exprimiert als bei physiologischem KM, sie werden als MRD-Follow-Up-Marker festgelegt.

4.3.2.3 Patient 2: MRD Tag 19

Aus insgesamt 20×10^6 kryokonservierten Zellen von Tag 19 resultierte eine Zellzahl von $7,27 \times 10^6$ Zellen. Wir färbten diese Probe mit den für den Patienten bei der Erstdiagnose (akutes Rezidiv) festgelegten MRD-Markern CD66c und CD123. Nach oben beschriebenem Gating auf B-lineage-Zellen (s. Abb. 4.21) folgt die weitere Auswertung analog zu Patientin 1. Dazu werden die Zel-

len gegen CD34 und CD10 aufgetragen. In diesem Dot Plot wird nun zunächst auf die CD34⁻/CD10⁺-Zellen gegatet (Abb. 4.31a, Gate MRD34-/10+) und die verbliebenen Zellen, d.h. potentielle Blasten, in Abb. 4.31b gegenüber den gefundenen MRD-Markern CD66c und CD123 aufgetragen. Als Kontrolle werden Zellen von regeneratorschen KM-Proben denselben Färbungen und Gating-Strategien unterzogen, das Ergebnis dieser Kontrolle zeigt Abb. 4.31c. Um die potentiellen Blasten in Abb. 4.31b nun der leukämischen Blastenpopulation oder aber physiologischen Zellen zuzuordnen, wurde in Abb. 4.31c ein Gate um die physiologischen Zellen gelegt (RC 66c/123 (CD34-)) und in die Auswertung der Patientenprobe übertragen (Abb. 4.31b). Es zeigte sich, dass viele potentielle Blasten in dem Gate der regeneratorschen Kontrolle zu liegen kommen, die darüberhinausgehenden Zellen werden schließlich mit dem Gate MRD 66c/123 (34-) in Abb. 4.31b erfasst und anschließend in der Populations-Statistik quantifiziert. Im nächsten Schritt wurden analog zur Auswertung der CD34⁻/CD10⁺-Zellen nun die CD34⁺/CD10⁺-Zellen analysiert (Abb. 4.32a, Gate MRD 34+/10+). Dies bedeutete wiederum die Durchführung derselben Färbungen und Gating-Strategien für Kontroll-KM bis zu diesem Schritt. Das Ergebnis für CD10⁺/CD34⁺-doppelpositive Zellen aus physiologischen KM zeigt Abb. 4.32c. Die Position dieser Zellen wurde mit dem Gate RC 66c/123 (34+) definiert und in Abb. 4.32b übertragen. Dies ermöglichte auch für diesen Zweig der Auswertung die Abgrenzung von leukämischen Blasten von regeneratorschen KM-Zellen. Für die abschließende Blastenquantifizierung mussten die gefundenen Blasten aus beiden Zweigen der Auswertungen, d.h. CD10⁺/CD34⁻ und CD10⁺/CD34⁺ in der Populations-Statistik addiert werden. Zur Kontrolle wird jeweils ein Backgating der gefundenen CD10-positiven Zellen in den AF350-Dot Plot (Vitalitätskontrolle, Abb. 4.31d bzw. Abb. 4.32d) sowie ein Backgating der Blasten in ein FSC/SSC-Dot Plot (Position im Lymphozytengate, Abb. 4.31e und Abb. 4.32e) durchgeführt.



MRD 1

dargestellt sind die Auswertungen von Markern, die bei der ED als Follow Up Marker definiert wurden:

MRD 34-/10+ :

CD66c
CD123

Regenerierende Kontrollen jeweils rechts.
Zuvor bekanntes B lineage Gating.

Abb. 4.31: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (1/3)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (a) analysiert. Es zeigen sich neben CD34⁺/CD10⁺-Zellen, auf die mit dem Gate MRD 34-/10+ gegatet wird auch CD34⁺/CD10⁻-Zellen, deren Auswertung in der folgenden Abb. 4.32 fortgeführt wird. Es folgt die Darstellung dieser Zellen in einem gemeinsamen Dot Plot für die festgelegten MRD-Marker CD66c und CD123 (b). Analog dazu werden CD34⁺/CD10⁻-Zellen aus physiologischen KM-Proben dargestellt (c) und mit dem Gate RC 66c/123 (34-) der Bereich definiert, in dem sich gesunde bzw. regenerierende KM-Zellen in einem MRD-analogen CD66c/CD123-Dot Plot befinden. Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert und mit dem Gate MRD 66c/123 (34-) die eigentlichen verbleibenden Blasten erfasst. Zur Kontrolle Backgating der CD10⁺-Zellen in den AF350-Dot Plot (d) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten.

Ergebnisse

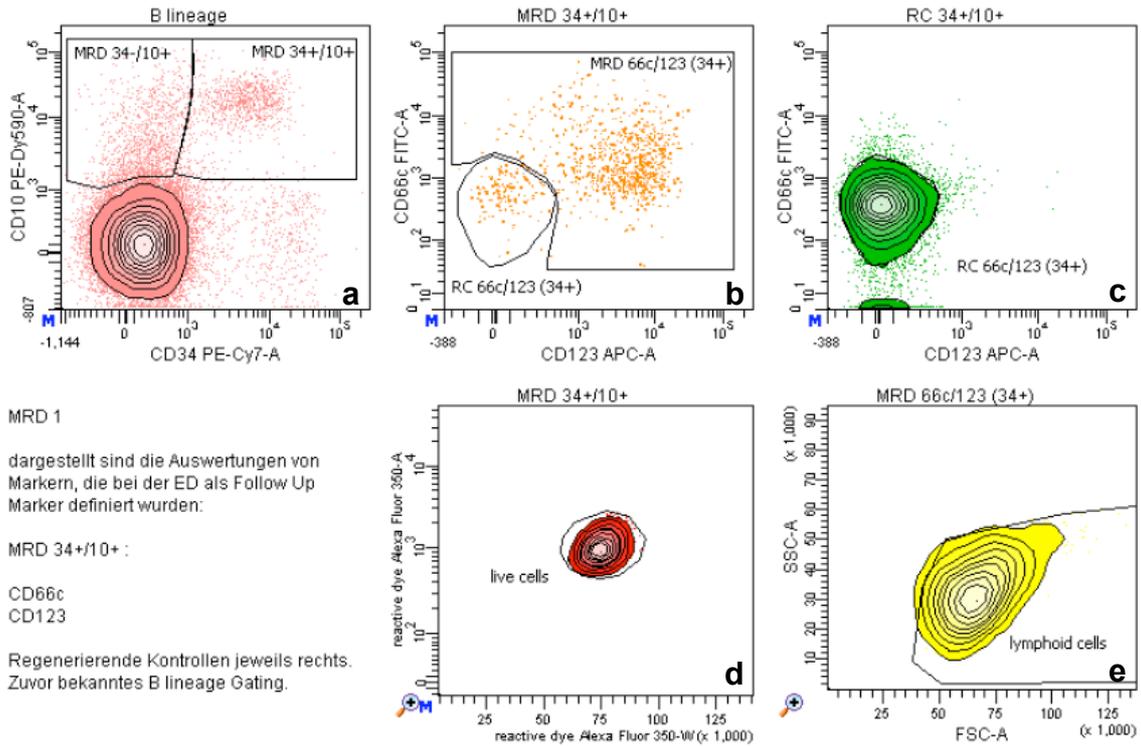


Abb. 4.32: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (2/3)

Neben den in der vorigen Abbildung analysierten CD34⁺/CD10⁺-Zellen wird im Dot Plot (a) nun auf die CD34⁺/CD10⁺-Zellen gateget (Gate MRD 34+/10+). Als Kontrolle werden in Abb. (c) CD34⁺/CD10⁺-Zellen nach vorigem Gating auf B-lineage-Zellen (s. Abb. 4.21) von physiologischen KM-Proben in einem zur MRD-Situation analogen CD66c/CD123-Dot Plot aufgetragen und mit dem Gate RC 66c/123 (34+) markiert. Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert, wo die CD34⁺/CD10⁺-Zellen der MRD-Probe angezeigt werden. Es wird deutlich, dass die CD34⁺/CD10⁺-Zellen des Patienten zu großen Teilen außerhalb der Region physiologischer Zellen liegen. Zur Kontrolle Backgating der CD10⁺-Zellen in den AF350-Dot Plot (d) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten.

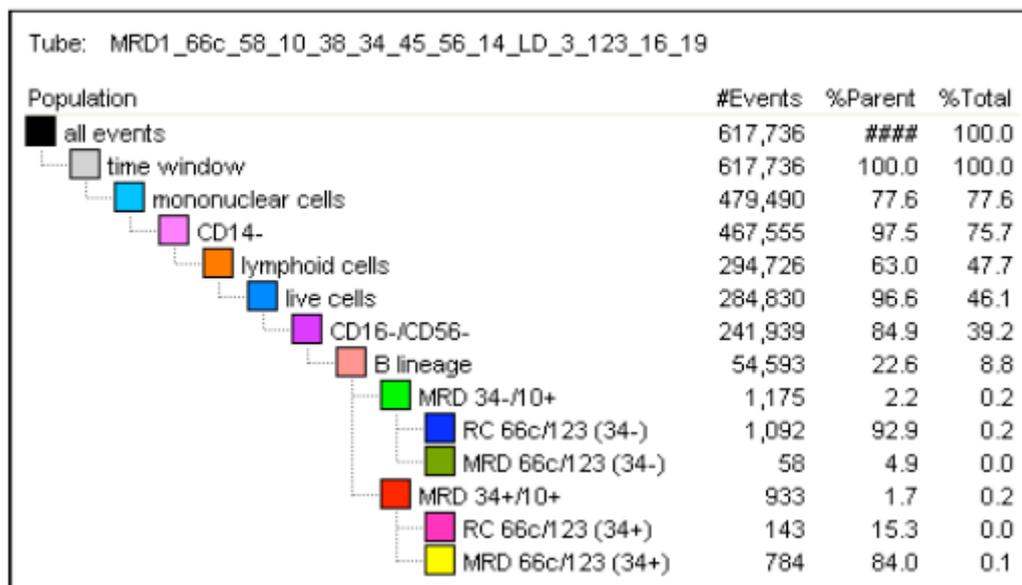


Abb. 4.33: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (3/3)

Darstellung der Populations-Hierarchie mit absoluten Zahlen und relativen Anteilen der jeweiligen Subpopulationen

Für die Auswertung (vgl. Abb. 4.33 und Korrekturrechnung wie in Kap. 4.2.3 beschrieben) ergab sich ein Anteil von CD66c/CD123-positiven Blasten an der Gesamtzahl der lymphoiden Zellen von:

$$\frac{1}{0,966 (\%p. \text{ live cells}) \times 0,63 (\%p. \text{ lymphoid cells})} \times \frac{58 (\text{MRD } 66c/123 (34-)) + 784 (\text{MRD } 66c/123 (34+))}{617736 (\text{time window})} \times 100$$

= 0,22 %

Die Messung dieser MRD erfolgte am Tag des Probeneingangs am FACSCalibur mit frischen Zellen. In die Auswertung ging jedoch lediglich CD66c als MRD-Marker ein, da CD123 nicht verfügbar war. Für CD66c ergab sich an diesem Gerät ein Blastenanteil von 0,232 %.

4.3.2.4 Patient 2: MRD Tag 106

Für die zweite MRD-Messung dieses Patienten an Tag 106 resultierte eine Zellzahl von $2,13 \times 10^6$ Zellen aus ursprünglich $8,2 \times 10^6$ kryokonservierten Zellen. Wir färbten diese Probe mit den für den Patienten festgelegten MRD-Markern CD66c und CD123 analog zur ersten MRD-Probe (s. Kap.4.3.2.3). Das Ergebnis zeigt deutlich, dass sich nach dem primären Gating auf B-lineage-Zellen praktisch keine potentiellen Blasten mehr nachweisen lassen. Nachfolgend abgebildet sind die Auswertungen der CD34⁻/CD10⁺-Zellen (null, s. Abb. 4.34b) und CD34⁺/CD10⁺-Zellen (vier, s. Abb. 4.35b) und die Blastenquantifizierung (Abb. 4.36).

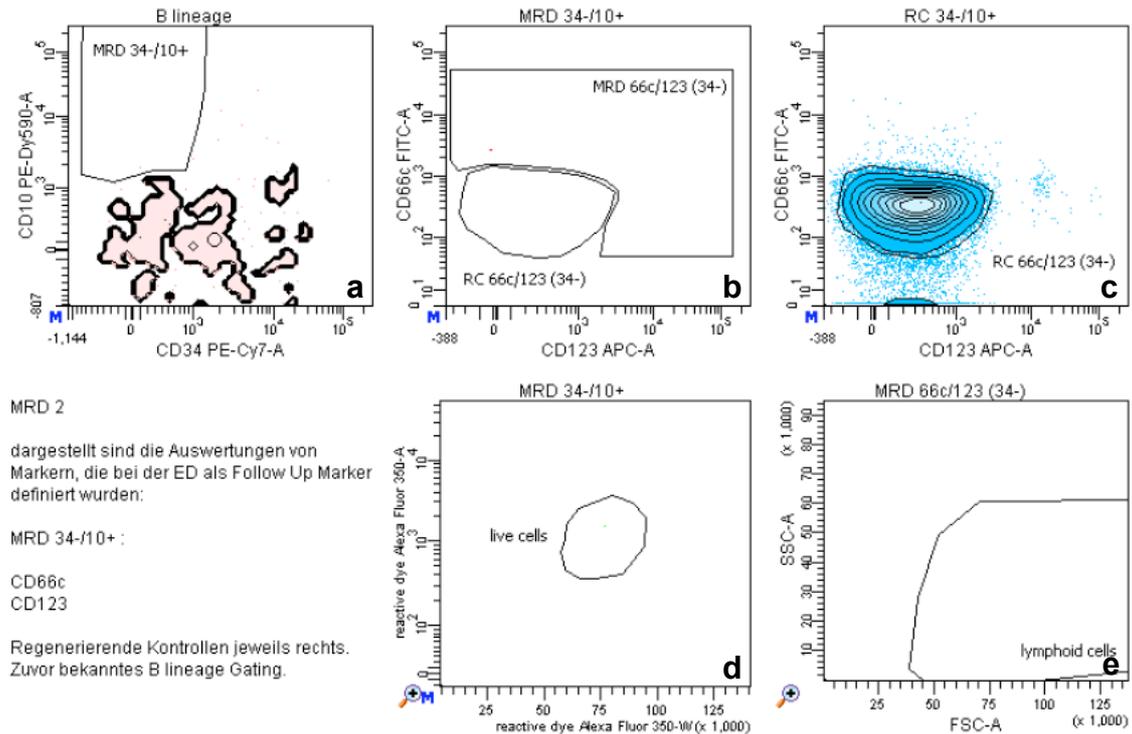


Abb. 4.34: Zweite MRD-Kontrolle Patient 2 (1/3)

Die zuvor im B-lineage-Gate ausgewählten Zellen (s. Abb. 4.21) werden im CD34/CD10-Dot Plot (Abb. a, veränderte Kontur-Plot-Darstellung aufgrund niedriger Zellzahl technisch bedingt) analysiert. Es zeigen sich neben einem einzelnen CD34⁺/CD10⁺-Dot, auf den mit dem Gate MRD 34-/10+ gegatet wird auch nur sehr wenige CD34⁺/CD10⁺-Zellen, deren Auswertung in der folgenden Abb. 4.35 fortgeführt wird. Es folgt die Darstellung dieser Zellen in einem gemeinsamen Dot Plot für die festgelegten MRD-Marker CD66c und CD123 (b). Analog dazu werden CD34⁺/CD10⁺-Zellen aus physiologischen KM-Proben dargestellt und mit dem Gate RC 66c/123 (34-) der Bereich definiert, in dem sich gesunde bzw. regenerierende KM-Zellen in einem MRD-analogen CD66c/CD123-Dot Plot befinden (c). Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert und mit dem Gate MRD 66c/123 (34-) die eigentlichen verbleibenden Blasten erfasst (b, 1 Dot). Zur Kontrolle Backgating der CD10⁺-Zellen in den AF350-Dot Plot (d, 1 Dot) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten (1 Dot).

Ergebnisse

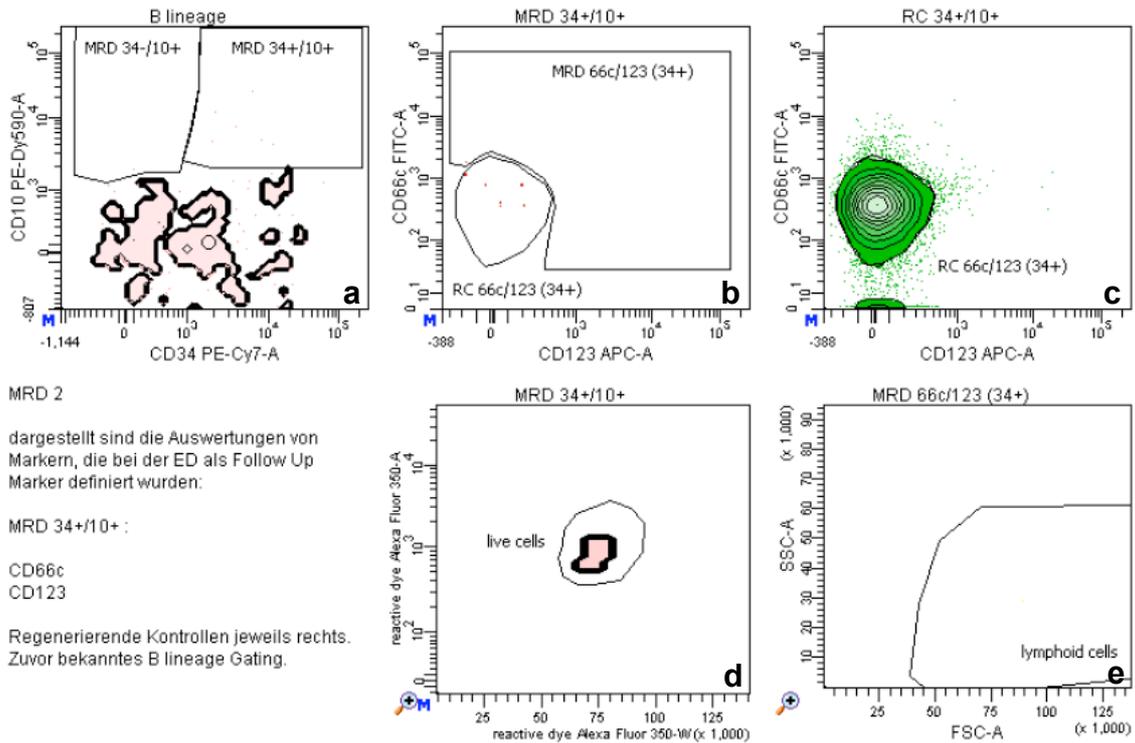


Abb. 4.35: Zweite MRD-Kontrolle Patient 2 (2/3)

Analyse der $CD34^+/CD10^+$ -Zellen (7 Dots, Gate MRD 34+/10+) im Dot Plot (Abb. a, veränderte Kontur-Plot-Darstellung technisch bedingt). Als Kontrolle werden $CD34^+/CD10^+$ -Zellen nach vorigem Gating auf B-lineage-Zellen (s. Abb. 4.21) von physiologischen KM-Proben in einem zur MRD-Situation analogen $CD66c/CD123$ -Dot Plot aufgetragen und mit dem Gate RC 66c/123 (34+) markiert (c). Dieses Gate wird in Abbildung (b) kopiert, wo die $CD34^+/CD10^+$ -Zellen der MRD-Probe angezeigt werden. Es wird deutlich, dass die vielen $CD34^+/CD10^+$ -Zellen der ersten MRD-Probe, die größtenteils außerhalb der Region physiologischer Zellen lagen, fast vollständig fehlen. Zur Kontrolle Backgating der $CD10^+$ -Zellen in den AF350-Dot Plot (d, 7 Dots) und FSC/SSC-Backgating (e) der identifizierten Blasten (1 Dot).

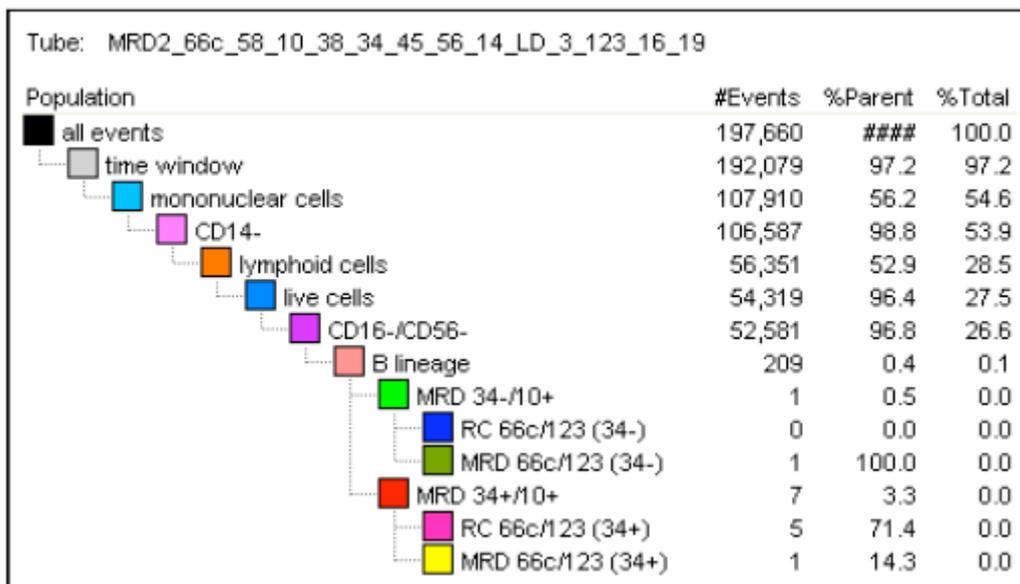


Abb. 4.36: Zweite-MRD Kontrolle Patient 2 (3/3)

Darstellung der Populations-Hierarchie mit absoluten Zahlen und relativen Anteilen der jeweiligen Subpopulationen

Für die Auswertung (vgl. Abb. 4.36 und Korrekturrechnung wie in Kap. 4.2.3 beschrieben) ergab sich ein Anteil von CD66c/CD123-positiven Blasten an der Gesamtzahl der lymphoiden Zellen von:

$$\frac{1}{0,964 (\%p. \text{ live cells}) \times 0,529 (\%p. \text{ lymphoid cells})} \times \frac{1 (\text{MRD } 66c/123 (34-)) + 1 (\text{MRD } 66c/123 (34+))}{192079 (\text{time window})} \times 100$$

= 0,002 %

Dies liegt unter der für die MRD-Bestimmung per Durchflusszytometrie angenommenen Nachweisgrenze von 1 in 10.000 Zellen (0,01 %). Die Messung dieser MRD erfolgte am Tag des Probeneingangs am FACSCalibur mit frischen Zellen. In die Auswertung ging jedoch lediglich CD66c als MRD-Marker ein, da CD123 nicht verfügbar war. Für CD66c ergab sich an diesem Gerät ein Blastenanteil von < 0,01 % (unter der Nachweisgrenze).

4.3.3 Zusammenfassung des Kapitels

Die dargestellten Fälle zeigen exemplarisch die praktische Anwendung der optimierten MRD-Diagnostik durch multicolor-FACS-Analysen auf Patientenproben. Bei beiden beschriebenen Patienten konnten jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose geeignete Marker identifiziert werden, um die MRD-Last im Verlauf von jeweils zwei Kontrollmessungen zu verfolgen. Durch die nun 4 verfügbaren Farben für Leukämie-Marker pro Röhrchen, statt bisher lediglich einer (neben dem jeweiligem Backbone), wurde eine MRD-Diagnostik mit exponentiellem Informationszuwachs bei gleichzeitig geringerem Materialbedarf aufgrund der Messung aller Parameter in nur einem Test-Tube ermöglicht. Dabei verbleiben noch immer zwei weitere freie Kanäle für zusätzliche MRD-Marker, sofern sich für Patienten bei der Erstdiagnose weitere aberrante Immunphänotypen identifizieren lassen.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse sollen bezugnehmend auf die einleitend erklärte Gliederung an dieser Stelle zusammengefasst werden (siehe auch Zusammenfassungen der Unterkapitel).

Für die Optimierung der MRD-Analyse am LSR II Durchflusszytometer untersuchten wir zunächst Proben von gesunden Probanden hinsichtlich ihrer Expression von MRD-relevanten Markerkombinationen, um diese physiologischen Zellpopulationen später von aberranten Immunphänotypen, wie sie bei leukämischen Blasten gefunden werden, abgrenzen zu können.

Um die jeweils identifizierten Blastenpopulationen genauer quantifizieren zu können, entwickelten wir einen neuen Auswertungsalgorithmus, durch den wir eine höhere Aufreinigung und somit eine Differenzierung von potentiellen Blasten von beispielsweise Zell-Dubletten oder toten Zellen erreichen konnten. Bei Patienten, für die innerhalb des untersuchten Antikörper-Panels kein geeigneter CD-Antikörper zur Verfügung stand, prüften wir erfolgreich das Prinzip der MRD-Bestimmung durch HLA-Antigene, um auch in diesen Fällen die MRD verfolgen zu können.

Den Schwerpunkt der Arbeit stellte der Transfer der MRD-Analysen vom 4-color-Durchflusszytometer FACSCalibur auf das multicolor-Durchflusszytometer LSR II dar. Dies bedeutete zunächst die technische Aufrüstung des Geräts, um die geplanten Analysen durchführen zu können. Um die MRD-Messungen auf die Analyse vitaler Zellen fokussieren zu können, entwickelten wir mittels des reaktiven Farbstoffs AlexaFluor350 eine Lebend/Tot-Differenzierung, die routinemäßig bei den MRD-Messungen eingesetzt werden sollte. Bedingt durch die zeitaufwändigen Färbeschritte stellten wir bisweilen relativ hohe Zellverluste bei unseren Experimenten fest, weshalb wir unterschiedliche Media zur Aufbewahrung der Zellen auf ihre Eignung prüften. Es zeigte sich bei proteinhaltigen Media wie PBSA, MACS-Puffer oder DMEM⁺ ein geringerer Zellverlust.

Durch Titration verschiedener Antikörper fanden wir eine feste Kombination für das neue 10-Farben-Backbone-Panel und eine geeignete Verteilung der Anti-

körper auf die einzelnen Kanäle unter Freihaltung der technisch besten Kanäle für die individuellen MRD-Marker. Nach der Einführung neuer Gating-Strategien für eine qualitativ gründlichere multicolor-MRD-Analyse sollten die Ergebnisse an zwei klinischen Fällen demonstriert werden.

Mit der neuen Methode gelingt es, bei den demonstrierten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose geeignete Marker zu identifizieren, um die MRD im Verlauf der Erkrankung nachzuverfolgen. Die berechneten Werte der MRD-Last liegen mit der neuen Methode sehr nahe an den am etablierten Durchflusszytometer bestimmten Werten. Durch die multicolor-MRD-Diagnostik konnte ein exponentieller Informationszuwachs bei gleichzeitig geringerem Materialbedarf erreicht werden, wobei durch verbleibende freie Kanäle und zukünftigen Einbau weiterer Detektoren noch nicht alle Möglichkeiten ausgeschöpft sind.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 Optimierung der MRD Messung am FACSCalibur

Die Anwendung der MRD-analytischen Messungen sind in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten für Durchflusszytometer mit bis zu 4 Farben (wie in unserem Fall dem BD FACSCalibur) bereits sehr genau vorbeschrieben.^{25,26} Bei unseren Experimenten an diesem Gerät wurde nach bekannten und in unserem Labor seit Jahren etablierten Arbeitsanleitungen und Protokollen vorgegangen. Bei neuen Versuchen oder neuen Reagenzien richteten wir uns nach den Angaben der jeweiligen Hersteller.

Die Anfänge der groß angelegten Forschung durchflusszytometrischer MRD-Analysen zu Beginn der 90er Jahre waren durch die begrenzte Verfügbarkeit von Antikörpern gegen Oberflächenantigene noch recht limitiert, besonders auch dadurch, dass der Nachweis vieler dieser Marker schon in den 80er Jahren auch für normale Zellen erbracht werden konnte, wie zum Beispiel TdT oder CD10, die auf normalen B-Vorläuferzellen wie auch auf vielen leukämischen Lymphoblasten des Knochenmarks exprimiert sind.^{16,17,58-60} Es wurde deutlich, dass diese und andere Marker nicht allein dazu benutzt werden konnten, um leukämische Zellen sicher zu identifizieren und zu quantifizieren. Derzeitige immunologische Ansätze zur Bestimmung der MRD bauen insbesondere auf Kombinationen von Oberflächenantigenen und anderen Markern auf, die im peripheren Blut oder Knochenmark normalerweise nicht beobachtet werden.²⁸ Durch Einsatz von Durchflusszytometern mit bis zu 4 Farben können heute mehrere verschiedene Marker und Markerkombinationen simultan untersucht werden; noch vor wenigen Jahrzehnten erfolgte dies lediglich für maximal zwei Farben durch Fluoreszenzmikroskopie und die Auszählung der Zellen war mühsam und zeitaufwändig.^{18,112} Wie bereits oben beschrieben lassen sich mithilfe der Multicolor-DC neben der Expression von Markern gleichzeitig auch Bilder über Vitalität und Zellmorphologie gewinnen. Zusätzlich können durch die Computer-unterstützte Auswertung und Zählung große Zellzahlen in kurzer Zeit un-

tersucht und durch nachfolgendes Sortieren oder anschließende FISH weiter analysiert werden.²⁵

In unserem Labor stand uns ein mit zwei Lasern ausgerüstetes FACSCalibur zur Verfügung, was die gleichzeitige Messung von vier Farben ermöglichte. Um die MRD eines Patienten im Verlauf untersuchen zu können, musste zunächst ein Panel exprimierter Marker definiert werden und ferner eine Expression dieser Marker auf Zellen von gesundem, regenerierendem Knochenmark zur Kontrolle bekannt sein. Wir setzten dies nach etablierten Protokollen²⁶ wie im Methodenteil ausführlich beschrieben für die zur Verfügung stehenden Antikörper um. Das Erreichen der oben diskutierten Sensitivität der DC von 1 in 10.000 Zellen erforderte wie von Campana et al. beschrieben die Messung möglichst hoher Zellzahlen (im Idealfall von mindestens 10^7 Zellen) und die Durchführung strenger Reinigungsvorgänge des Fluidiksystems. Beides setzten wir wie im Methodenteil beschrieben durch stetes Leermessen der Test-Tubes, regelmäßige Kontrollen (Kalibrierung und Kompensation), Fluidik-Spülungen und vorsichtiges Handling zur Vermeidung von „carry-over“ bestmöglichst um. Zu diskutieren bleibt dennoch eine Abhängigkeit der Messergebnisse von Fehlerquellen, die beim Umgang mit den Zellen, bei der subjektiven Definition mancher Gates oder der maximal verfügbaren Zellzahl entstehen. Schließlich sind auch Faktoren wie die Anzahl gesunder Kontrollen (8 am FACSCalibur, 13 am LSR II) und die Überprüfung der Sensitivität aller eingesetzten Marker an diesem Material, die interne Kontrolle (durch Backgating) sowie die Fc-Rezeptor-Blockung (zur Vermeidung der Bindung unspezifischer Antikörper) entscheidend für die richtige Zuordnung von Zellen zur Blastenpopulation. Nur unter Beachtung dieser Anforderungen und Fehlerquellen nach aktuellem wissenschaftlichem Stand²⁵ sowie dem Miteinbezug der Ergebnisse des KMT-Labors und anderer MRD-Zentren in die eigene Auswertung gelang die Umsetzung der Optimierung der MRD-Messung am FACSCalibur und damit die Grundlage für die Übertragung der Experimente auf das neue Multicolor-Durchflusszytometer LSR II.

5.1.2 Neuerungen am LSR II Durchflusszytometer

Das Monitoring der minimalen Resterkrankung mittels 3- oder 4-Farben-Durchflusszytometrie hat sich in den vergangenen Jahren zu einer Standardmethode entwickelt, die zwar einerseits meist sehr zuverlässig funktioniert, andererseits durch die maximale Anzahl gleichzeitig detektierbarer Fluorochrome in ihren Möglichkeiten der Analyse von Zellen begrenzt ist. Mit der Entwicklung der polychromatischen Durchflusszytometrie waren einige wichtige Vorteile verbunden: Die simultane Messung einer größeren Zahl von Zelleigenschaften aus demselben Messröhrchen bedeutet insgesamt eine Einsparung von Zellmaterial. Da die zusätzlich gewonnenen Informationen auf dieselben Zellen bezogen werden, von denen auch bisher gemessene Informationen stammen, steigt der Informationszugewinn dabei in exponentiellem statt linearem Maße. Bei einer Untersuchung von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut von sechs Patienten mit AML gelang es Björklund et al. im Jahr 2009 unter Einsatz einer 8-Farben-Durchflusszytometrie eine minimale Resterkrankung bei allen Patienten nachzuweisen. Die Messung derselben Proben erbrachte in einer zuvor angewendeten 3-Farben-Durchflusszytometrie lediglich bei drei der sechs Patientenproben den Nachweis aberranter Zellpopulationen im Sinne einer vorhandenen MRD.¹¹ Beim Vergleich der zwei Methoden stellte sich die polychromatische Durchflusszytometrie gegenüber der 3-Farben-Technik als die genauere Methode zur Identifikation CD34-positiver Zellsubtypen sowie als effizienter in der Detektion aberranter Zellpopulationen heraus (siehe auch Kap. 5.1.4: Vorteile und Nachteile gegenüber dem FACSCalibur und Kap. 5.2: Multicolor-Durchflusszytometrie bei MRD-Messungen).

5.1.3 Transfer und Etablierung der MRD am LSR II

Die bisherigen Messungen der minimalen Resterkrankung am 4-Farben-Durchflusszytometer FACSCalibur auf das Multi-Color-Durchflusszytometer LSR II zu übertragen, erforderte mehrere Vorbereitungen und Überlegungen: Dem Vorteil mit dem Multi-Color-Durchflusszytometer mehr Parameter als bis-

lang möglich simultan erfassen zu können, standen mehrere technische Herausforderungen entgegen, die nachfolgend diskutiert werden sollen.

Um Probenmaterial von Patienten mit Leukämie in Bezug auf Zelllinie und Immunphänotyp hinreichend genau und in möglichst wenigen Messröhrchen analysieren zu können, geht man nach der raschen Weiterentwicklung der Mehrfarben-Durchflusszytometrie in den vergangenen Jahren heutzutage von einem Bedarf von mindestens 9 bis 10 Farben aus, wie mehrere wissenschaftliche Untersuchungen zeigen.^{8,37,86} Diese Anforderungen umzusetzen erfordert eine sorgfältige Konfiguration der Mess- und Auswertungseinheiten sowie regelmäßige Wartungen, Pflege und Qualitätskontrollen, die wir, wie bereits oben beschrieben, umsetzten. Mit zunehmender Zahl von im selben Messröhrchen eingesetzter Fluorochrome steigt auch die Signalüberlappung in den einzelnen Spektralbereichen der Detektoreinheiten, was eine Verschlechterung des sogenannten Signal-Rausch-Verhältnisses (signal-to-noise ratio) verursacht, einen größeren Toleranzbereich bei der Signaldetektion, d.h. höhere Kompensationswerte, erfordert und gleichzeitig eine Sensitivitätsabnahme bedeutet.¹¹⁸ Als Lösungsansatz testeten wir den Einsatz unterschiedlicher, d.h. optisch breiterer und engerer Filter und verschiedene Kompensationsmechanismen wie im Methodenteil ausführlicher beschrieben; dabei bestätigte sich die bessere Eignung eher breiterer Filter durch den Vorteil höherer Signalausbeuten gegenüber zu enger Filter, die zwar geringere Kompensationswerte erfordern, jedoch auch zu Signalintensitätsverlusten und damit Datenverlusten führen.

Neben der Auswahl geeigneter Filter ist auch die elektrische Spannung an den einzelnen Detektoren (voltages) ausschlaggebend für die Datenaquisition. Wie von Wood et al. beschrieben ist sie hoch genug zu wählen, dass die Autofluoreszenz von negativen Zellen oder Beads über dem Rauschsignal liegt um die gewünschte Sensitivität auch bei kleinen Zellzahlen zu erreichen. Sie sollte jedoch nicht zu hoch gewählt werden, um kein zu hohes Signal von negativen Zellen zu verursachen.¹¹⁸ Es ist außerdem bekannt, dass eine zu hohe Flussgeschwindigkeit der Zellsuspension in der Messkammer durch die elektronische Totzeit bei digital arbeitenden Durchflusszytometern (zu diesen zählt auch das LSR II) dazu führen kann, dass nicht alle Events verarbeitet werden können,

was wiederum Datenverlust bedeutet. Um diesem Effekt vorzubeugen, wählten wir für alle unsere Analysen die langsamste Flussgeschwindigkeit (Einstellung „low“). Wir achteten außerdem darauf, die Konzentration der Zellsuspension konstant und nicht zu hoch (maximal 5.000 Events pro Sekunde, vom Hersteller wird eine maximale Verarbeitung von 10.000 Events pro Sekunde angegeben) einzustellen, da dies ebenfalls zu Datenverlust durch Überschreitung der Totzeit führen kann. Als Nachteil steht beiden Ansätzen jedoch die sehr viel längere Aquisitionszeit gegenüber. Andererseits steigt mit höheren Konzentrationen der Zellsuspension und höherer Flussgeschwindigkeit, d.h. auch breiterer Strahl, das Auftreten von Zelldubletten, die wir durch bestimmte Gates von der Analyse auszuschließen versuchten (siehe Methodenteil).

Schließlich war die Einstellung der Kompensation der verschiedenen optisch benachbarten Kanäle eine zentrale Herausforderung bei der Umsetzung unserer Messungen auf das Mehrfarben-Durchflusszytometer. Die richtige Wahl einer geeigneten Kompensation ist insbesondere bei der Verwendung von mehr als vier Farben elementar für den Erfolg der Analysen und die nachfolgend richtige Interpretation der Daten.⁹² Diese erfolgt bei mehr als vier Farben nicht mehr durch manuelle Einstellung, sondern automatisiert durch die verwendete Software. Trotzdem ist bei der Definition der Kompensation insbesondere bei Tandem-Farbstoffen, wie beispielsweise PE-Cy7 und APC-H7, die in unseren Versuchen verwendet wurden, darauf zu achten die Kompensation der einzelnen Fluorochrome separat durchzuführen, da die Emissionsspektren der Tandem-Farbstoffe je nach Hersteller oder Charge variabel sein können. Je nach Antikörper-Reagenz finden sich außerdem unterschiedliche relative Intensitäten der Fluorochrome (dies ist auch wichtig für die Zuordnung eines Markers zu seinem konjugierten Fluorochrom) und Effekte wie unspezifische Bindungen (bestimmte Fluorochrome zeigen eine vermehrte Bindung an tote Zellen oder „debris“) oder Antikörper-Wechselwirkungen (wichtig bei der Erstellung eines sogenannten Backbone-Antikörperpanels).¹¹⁸ Wir verfolgten diese Überlegungen durch Beachtung der Herstellerangaben und regelmäßige Testfärbungen mit Blutproben. Die Auswahl der gleichzeitig einzusetzenden Fluorochrome musste also sorgfältig und im Hinblick auf die einzelnen Anregungs- und Emissionsbereiche und

deren Wellenlängen-Überlappungen erfolgen. Zusätzlich zu diesen physikalischen Überlegungen mussten die in Frage kommenden Fluorochrome für den qualitativen und quantitativen Nachweis des jeweiligen Zielantigens auch bei sehr geringen Konzentrationen noch geeignet sein sowie in Kombination mit dem gesuchten Konjugat (z.B. CD34-PerCP) verfügbar sein.

Bei unseren Messungen stellten wir fest, dass einzelne Antikörper auch in einer Verdünnung bis auf 1/20 der vom Hersteller empfohlenen Konzentration noch sehr gut nachweisbar sind (s. Ergebnisteil, Kap. 4.2.2: Ergebnisse der Antikörper-Titrations). Dies bedeutete neben der Einsparung von Antikörpern auch günstige Auswirkungen auf die Kompensation, da der Einsatz von weniger konjugierten Fluorochromen in den benachbarten Kanälen weniger Störsignale verursacht. Bei der Erstellung unseres 10-Farben-Backbones (s. Tab. 4.4), d.h. der Zuordnung der in jedem Messröhrchen benötigten Antikörper zu den einzelnen Kanälen, gingen wir nach etablierten Prinzipien vor, wie von Wood et al. ausführlich beschrieben.¹¹⁸ Dies bedeutete zunächst die Identifizierung einer Gruppe von Zielantigenen und anschließend die Zuordnung zu den Kanälen, wobei grundsätzlich darauf geachtet werden musste höher exprimierte Antigene schwächeren Fluorochromen und lediglich schwach exprimierte Antigene helleren Farben zuzuordnen um Schwierigkeiten bei der Kompensation sowie Einschränkungen in der Sensitivität zu vermeiden. Mit dem oben gezeigten Backbonepanel fanden wir einen Kompromiss zwischen der generellen Umsetzung dieses Prinzips, den tatsächlichen Begebenheiten der Signalintensitäten bei unseren Messungen und der Verfügbarkeit konjugierter Fluorochrome auf dem Markt. Vor dem Hintergrund zunehmender Herstellerangebote zu Konjugation von Antikörpern mit Fluorochromen nach eigenen Wünschen sind was diesen Punkt betrifft zukünftig erweiterte Möglichkeiten zu erwarten.

Schließlich galt es die durch die zusätzlich eingesetzten Farben ermöglichten Messungen richtig zu interpretieren. Bei der Mehrfarben-Durchflusszytometrie steigt selbstverständlich die Schwierigkeit der Datenvisualisierung und -analyse durch zunehmende Komplexität. Hierzu stand uns am LSR II mit FACSDiva eine potente Software sowohl zur Datenaquisition als auch für spätere Auswertungen zur Verfügung. Da jedoch bei der üblichen Ausgabe der Daten lediglich

2-Parameter-Dot Plots verwendet werden, ergibt sich bei einem Experiment mit 9 Farben theoretisch eine Anzahl von 55 Dot Plots um alle Parameter gegeneinander aufzutragen,¹¹⁸ was die Entwicklung einer primären Gating-Strategie zur Erfassung der jeweils für die Fragestellung relevanten Zellen erforderte, bevor diese Zellen der weitergehenden Analyse unterzogen werden konnten (siehe Ergebnisteil unter Kap. 4.2.3: Entwicklung von Gating- und Auswertungsstrategien am LSR II).

5.1.4 Vorteile und Nachteile gegenüber dem FACSCalibur

Die Vorteile und Nachteile eines digital arbeitenden Mehrfarben-Durchflusszytometers wie dem LSR II gegenüber einem analogen 4-Farben-Durchflusszytometer wie dem FACSCalibur lassen sich in allgemeine und MRD-spezifische Vor- und Nachteile unterteilen. Einige der allgemeinen Änderungen sind bereits im vorangehenden Kapitel vorbeschrieben. Dazu zählen beispielsweise die schnellere Aquisitionszeit und der exponentiell steigende Informationzuwachs durch die Möglichkeit des gleichzeitigen Einsatzes mehrerer Farben im selben Messröhrchen. Durch die Verfügbarkeit einer wachsenden Vielfalt geeigneter Fluorochrome und technische Fortschritte bei der Herstellung der Geräte konnte die Entwicklung der sogenannten multi-color-Durchflusszytometrie, d.h. neun bis zehn und mehr Farben, in den letzten Jahren stark vorangetrieben werden.^{8,37,86} Speziell für die Analysen der minimalen Resterkrankung bekommen andere Vorteile ein besonderes Gewicht: Im klinischen Alltag wird es zunehmend notwendig, auch sehr geringe Mengen an Probenmaterial richtunggebend untersuchen zu können. Insbesondere bei Kindern liegt es auf der Hand, dass die Probengewinnung vor allem bei Knochenmarkpunktionen sehr oft schwieriger und weniger ergiebig ist als bei Erwachsenen. Des Weiteren bedingt das Ergebnis einer Analyse der MRD oft unmittelbare Therapieentscheidungen, beispielsweise eine intensiviertere Polychemotherapie bei Nachweis einer vorhandenen oder im Verlauf angestiegenen MRD. Ebenfalls wichtig bei MRD-Fragestellungen ist oft die Zuordnung von Zellen entweder zu einer krankheitsspezifischen oder zelllinientypischen Gruppe von Antigenen, was durch eine Kombination von mehr als nur vier Farben gleichzei-

tig realisierbar wird. So ist es zum Beispiel bei der generellen Untersuchung von B-Zellen interessant die Marker CD45, CD19, CD20, CD10, CD5, CD38, CD34 und eventuell auch κ - und λ -Leichtketten einzuschließen. Dies macht zusammen bereits eine Anzahl von neun Farben, was derzeit gut im Bereich der Möglichkeiten eines Mehrfarben-Durchflusszytometers wie dem LSR II liegt.¹¹⁸ Diese Verbesserung der Charakterisierung auf dem Niveau einzelner Zellen stellt nicht nur einen allgemeinen, sondern insbesondere auch einen schwerpunktmäßigen Vorteil bei MRD-Analysen dar, weil genau dies im Mittelpunkt der Fragestellung, nämlich der Zuordnung von Zellen zur Blastenpopulation, steht. Durch die Tatsache, dass die gleichen Analysen mit weniger Messröhrchen durchgeführt werden können, wird es möglich, mehr Zellen pro Messröhrchen einzusetzen, woraus einerseits die schnelleren Messzeiten resultieren, andererseits bestimmte Messungen, bei denen die Gesamt-Zellzahlen der limitierende Faktor sind (beispielsweise bei der Analyse von Liquor cerebrospinalis), überhaupt erst umsetzbar werden. Da es bei MRD-Analysen mehr um relative statt um absolute Zahlen geht (Blastenanteil statt absoluter Anzahl an Blasten in einer Probe), bedeutet die Quantifizierung einer Probe mit einer größeren Zellzahl eine Zunahme von Genauigkeit und Sensitivität (um die erforderliche Sensitivität von 10^{-4} zu erreichen bedarf es beispielsweise mindestens der Messung von 10.000 Zellen; bei unseren Versuchen führten wir die Messung stets solange weiter, bis das Messröhrchen leer war).

Bei den Nachteilen der multi-color-Durchflusszytometrie stehen die damit verbundenen gesteigerten Kosten im Vordergrund, vor allen Dingen aufgrund von spezifischeren und aufwändiger herzustellenden Reagenzien. Zudem sind größere Erfahrungen im Umgang mit den verschiedenen technischen Fragestellungen sowie bei der komplexeren Auswertung und Interpretation der Daten notwendig. Des Weiteren können bei der Kombination einer steigenden Zahl an Testreagenzien in vitro auch negative Effekte wie beispielsweise Antikörper-Interaktionen, unspezifische Bindungen, sterische Hinderung oder die Instabilität von Tandem-Antikörpern zunehmen. Insgesamt sollten bei der Anwendung der Mehrfarben-Durchflusszytometrie im Rahmen von MRD-Messungen allerdings die Vorteile überwiegen, und zwar hauptsächlich aufgrund der erhöhten

Genauigkeit bei der Identifikation von Blastenpopulationen und der größeren Informationsgewinnung auch bei Probenmaterial mit nur sehr geringen Gesamtzellzahlen.^{8,118}

5.1.5 Diskussion der Einzelmessungen

Wie im Ergebnisteil ausführlich dargestellt erreichten wir bei beiden Beispielpatienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose die Identifikation von Markern, die im weiteren Verlauf der Erkrankung zur Messung der minimalen Resterkrankung geeignet waren.

Für die erste Patientin kamen nach den Messungen von Knochenmark bei Erstdiagnose am LSR II CD66c und CD135 als Follow-Up-Marker in Betracht. Bei den Analysen der Erstdiagnose am bereits etablierten Durchflusszytometer FACSCalibur konnte seinerzeit CD66c ebenfalls als geeigneter Marker definiert werden, der Marker CD135 wurde zu jener Zeit aus Gründen der geringen Gesamtzellzahl oder schlechter Verfügbarkeit nicht mituntersucht. Dies veranschaulicht sehr gut die im vorangehenden Kapitel beschriebenen Vorteile einer multi-color-Durchflusszytometrie: Die Färbung mit CD135 zur Prüfung, ob es sich hierbei um einen geeigneten Marker handeln könnte, war trotz einer sehr geringen Gesamtzellzahl von lediglich $1,7 \times 10^6$ Zellen möglich, wobei sich diese niedrige Zellzahl sicherlich durch die Kryokonservierung erklären lässt. Bei der Messung der ersten MRD-Probe dieser Patientin an Tag 15 nach Erstdiagnose ergab sich am LSR II für CD66c und CD135 ein kombinierter Blastenanteil von 0,14 %, bei den zuvor durchgeführten Messungen am FACSCalibur von 0,17 %, wobei die Blasten hier wie oben beschrieben lediglich über CD66c analysiert wurden. Dieser erhöhte Blastenanteil trotz der Tatsache, dass nur ein statt zwei Marker untersucht wurden, ist am ehesten durch vermehrte Mitkalkulation von „debris“, Zell-Dubletten, toten Zellen oder falsch positiven Zellen zu erklären. Dennoch liegen beide Ergebnisse in vergleichbaren Größenordnungen. Bei der zweiten MRD-Bestimmung in der 12. Woche nach Erstdiagnose bestimmten wir am LSR II einen Blastenanteil von 0,22 % für diese Patientin, bei der zuvor erfolgten Messung am FACSCalibur einen leicht niedrigeren Anteil von 0,13 % (wiederum nur unter Berücksichtigung von CD66c), der mög-

licherweise durch eine erhöhte Zahl falsch CD66c-positiver Zellen, oder eines gegenteiligen Effekts durch die Kryokonservation der am LSR II gemessenen Probe bedingt war.

Beim zweiten Patient definierten wir anhand von kryokonserviertem Knochenmark vom Zeitpunkt der Erstdiagnose (akutes Rezidiv) CD66c und CD123 als Follow-Up-Marker. Damit übereinstimmend fand sich auch bei der Analyse am FACSCalibur CD66c als geeignetster Marker, CD123 wurde wie im Fall von CD135 aufgrund fehlender Verfügbarkeit bei der Erstdiagnose von Patientin 1 zu diesem Zeitpunkt nicht mitbestimmt. Bei der Berechnung der minimalen Resterkrankung 19 Tage nach Erstdiagnose fand sich für diesen Patient am LSR II für CD66c und CD123 ein kombinierter Blastenanteil von 0,22 %. Der zuvor am FACSCalibur nur für CD66c berechnete Blastenanteil betrug 0,23 % und kommt dem Ergebnis der Analyse mit dem multi-color-Durchflusszytometer sehr nahe. Die MRD-Bestimmung desselben Patienten 106 Tage nach Erstdiagnose erbrachte am LSR II einen prozentualen Blastenanteil von 0,002 % (CD66c und CD123 kombiniert) und am FACSCalibur (nur CD66c) einen Blastenanteil von < 0,01 %. Beide Werte liegen unter der per Durchflusszytometrie laborpraktisch angenommenen Nachweisgrenze von 1 in 10.000 Zellen (entsprechend 0,01 %).

Zur weiteren Diskussion dieser Messungen steht das allgemeine Problem der subjektiven Gate-Definition bei FACS-Auswertungen: Gegenüber dem FACSCalibur hatten wir dank der Verwendung einer anderen Akquisitions- und Auswertungssoftware am LSR II die Möglichkeit, theoretisch eine unbegrenzte Anzahl Gates in die Auswertungsmasken einzufügen. Mit steigender Zahl eingesetzter Farben und analysierten Gesamtzellzahlen steigen jedoch auch die Anforderungen an die Rechenleistung des Auswertungscomputers, was das Arbeiten mit Gates, insbesondere auch bei Verwendung von Backgatingstrategien zur Plausibilitätskontrolle wie in Kap. 4.2.3 ausführlich beschrieben, in der Praxis doch limitiert. Dies bedeutet, dass die Einführung und Verteilung neuer Gates in den Auswertungsmasken sorgfältig und sinnvoll durchgeführt werden muss. Außerdem ist es notwendig, bestimmte Gates individuell für jede Probe und jeden Patient zu verändern, dies betrifft neben primären Gates zur Auswahl

der gefragten Zellen (lineage gating) insbesondere die Gates zur Markierung potentieller Blasten als Bedingung für die nachfolgende Quantifizierung. Da diese Positionierung der Gates nicht automatisch oder standardisiert (beispielsweise durch die Software) erfolgen und bei unsauberer Trennung zweier Zellpopulationen auch schwierig sein kann, bleibt dieser Schritt in der Auswertung untersucherabhängig und erfordert entsprechende Vorerfahrung.

Dennoch zeigen mehrere Studien konkordante Ergebnisse von durchflusszytometrischer versus PCR-basierter Bestimmung der MRD: In einer Studie von Kerst et al. aus dem Jahr 2005 mit 45 ALL-Patienten (37 B-ALL- und 8 T-ALL-Patienten) konnten mittels Durchflusszytometrie in 91 % der Fälle Leukämie-assoziierte Immunphänotypen für eine MRD-Bestimmung auf dem Sensitivitätsniveau von 10^{-4} gefunden werden und in 84 % der Fälle ein Antigen-Rezeptor-Genrearrangement durch PCR nachgewiesen werden. Die Kombination beider Methoden erlaubte ein Monitoring der minimalen Resterkrankung in 100 % der Fälle. Mittels der eingesetzten Antikörper-Panels gelang die MRD-Bestimmung durch Durchflusszytometrie bei 90 % der B-ALL-Patienten und bei 100 % der T-ALL-Patienten, eine Limitation bestand in der maximal möglichen Anzahl an Kombinationen.⁶³ Da diese Versuche jedoch mit einem 4-Farben-Durchflusszytometer durchgeführt wurden, ist anzunehmen, dass diese Einschränkungen durch die erweiterten Möglichkeiten eines multi-color-Durchflusszytometers reduziert werden. Malec et al. untersuchten insgesamt 89 Follow-Up-Proben von 23 Patienten mit ALL mittels Durchflusszytometrie und PCR und wiesen bei 70 Proben signifikant konkordante Resultate (78 %, $p < 0,001$) auch im weiteren Verlauf nach. Von 29 Patienten, die nach Abschluss der Induktionstherapie untersucht wurden, zeigte sich bei 18 (62 %) eine nachweisbare minimale Resterkrankung per Durchflusszytometrie und bei allen sechs Patienten, die im Verlauf ein Rezidiv erlitten, stiegen im Vorfeld die per Durchflusszytometrie ermittelten MRD-Lasten an.⁷⁴ Beide Studien unterstreichen die klinische Bedeutung von MRD-Messungen insbesondere per Durchflusszytometrie.

Um die in dieser Arbeit vorgestellte Methode in die klinische Routine umzusetzen, bedarf es selbstverständlich weiterer Versuche und empirischer Vergleiche

der Ergebnisse zwischen beiden Durchflusszytometern bzw. mit PCR mit größeren Fallzahlen. Ferner unterscheiden sich die innerhalb der gezeigten zwei Patienten verglichenen Ergebnisse dadurch, dass einmal frisches Probenmaterial, bei den Messungen am LSR II jedoch kryokonserviertes Probenmaterial verwendet wurde. Zudem wurden zur Differenzierung potentieller Blastenpopulationen von gesundem oder regenerierendem Knochenmark an den zwei Geräten etwas andere „Template-Diagnosen“ verwendet. Dennoch liegen die beschriebenen Ergebnisse allesamt im selben Größenbereich und erscheinen daher, auch aufgrund Beachtung der in Kap. 5.1.3 diskutierten Prinzipien im Umgang mit Mehrfarben-Durchflusszytometern, plausibel. Neben der systematischen Überprüfung mit größeren Fallzahlen soll in der Zukunft auch die MRD-Bestimmung mittels HLA-Antigenen am LSR II versucht werden (siehe auch Kap. 5.3: Ausblick).

5.1.6 MRD-Bestimmung mittels HLA-Antikörpern

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt besteht durch die Verwendung von Antikörpern gegen HLA-Antigene im Rahmen der MRD-Messungen eine weitere Möglichkeit, auch bei solchen Patienten noch einen Marker für den Verlauf der MRD zu finden, bei denen sich anhand der CD-Antigene keine geeignete Markerkombination finden ließ. In Frage kam dieses Vorgehen bei allogenen transplantierten Patienten, bei denen sich durch eine haploidentische Transplantation (Mismatch in 3-5 HLA-Allelen) eine Differenz für bestimmte HLA-Antigene ergeben hatte. Bei haploidentisch transplantierten Patienten stehen so weitere Marker zur Verfügung, die die Sensitivität der MRD-Messung erhöhen können, bzw. bei schwierigem Nachweis überhaupt erst ermöglichen können. Das Prinzip der durchflusszytometrischen Überwachung von Chimärismus und minimaler Resterkrankung mittels HLA-Antikörpern ist in der neueren Literatur von unserer Arbeitsgruppe als einfache und hochsensitive Methode vorbeschrieben.⁹⁶ Gegenüber den Standardtechniken zum Chimärismuskachweis durch fluorescence in situ hybridization (FISH) von Geschlechtschromosomen^{45,69,84,106} einerseits und der Untersuchung von DNA-Mikrosatelliten (sogenannten short tandem repeats) durch PCR^{5,42,119} andererseits ermöglicht die Durchflusszytometrie die

Analyse auf der Ebene einzelner Zellen oder bestimmter Subtypen. Dies stellt gemeinsam mit der Schnelligkeit und Genauigkeit der Analyse auch großer Zellzahlen den wichtigsten Vorteil gegenüber den Standardmethoden dar. In einer Studie mit 23 HLA-mismatched-transplantierten Patienten fanden Schumm et al. bei 100 % der Spender-Empfänger-Paare geeignete HLA-Antikörper (meistens durch Mismatch in den HLA-Gruppen Bw4 oder Bw6) für das durchflusszytometrische Monitoring von Chimärismus und minimaler Resterkrankung anhand aberranter Immunphänotypen. Die gefundenen Daten wurden durch PCR-Analysen als eine der Standardtechniken bestätigt.⁹⁶ Der Einschluss HLA-basierter Antikörper-Panels in die Messungen der minimalen Resterkrankung mittels Durchflusszytometrie bedeutet also einen zusätzlichen Informationsgewinn und somit eine weitere Verbesserung der Methode, weshalb geplant ist, dies nach einem sogenannten proof of principle am FACSCalibur zukünftig auch für die Messungen am Mehrfarben-Durchflusszytometer LSR II einzuführen und weiterzuverfolgen.

5.2 Multicolor-Durchflusszytometrie bei MRD-Messungen

5.2.1 Wissenschaftliche Einordnung

Die Bedeutung der durchflusszytometrischen Bestimmung der minimalen Resterkrankung neben anderen Methoden wie PCR-basierten Untersuchungen wurde in den vergangenen Jahren in einigen Studien vergleichend untersucht (siehe Kap. 1.3). Es hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse in der Mehrzahl der Fälle konkordant sind, wobei für die PCR-basierte MRD eine etwas höhere Sensitivität angenommen wird.^{63,74} Malec et al. belegten in einer Studie mit 71 Proben von 22 pädiatrischen ALL-Patienten eine signifikante Konkordanz der MRD-Ergebnisse von 72 % ($p < 0,001$) im direkten Vergleich zwischen PCR und Durchflusszytometrie, auf einem Sensitivitätsniveau von 0,01 % sogar von 89 %. Dabei wird der Großteil der diskordanten Ergebnisse beim direkten Vergleich der zwei Methoden durch die begrenzte Sensitivität der Durchflusszytometrie im Bereich zwischen 0,01 % und 0,001 %, der andere Teil durch instabile Genrearrangements oder quantitativer Beschränkungen seitens der PCR er-

klärt.⁷⁵ Die empirisch durchgeführten Experimente mit größeren Fallzahlen zur Bestimmung der minimalen Resterkrankung durch Durchflusszytometrie wurden bei allen recherchierten Studien bislang jedoch nur auf in der klinisch-labortechnischen Praxis etablierten Durchflusszytometern mit maximal vier Farben untersucht. Empirisch durchgeführte Studien zur MRD-Bestimmung auf multi-color-Durchflusszytometern stehen noch aus und sind Gegenstand aktueller Forschung. Die experimentelle Anwendung solcher Geräte im klinischen Routinebetrieb wird derzeit für unterschiedliche Fragestellungen näher untersucht und in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der minimalen Resterkrankung kindlicher Leukämien veranschaulicht.

Gegenüber älteren Studien, in denen 4-Farben-Durchflusszytometer verwendet wurden, bieten die multi-color-Geräte die bereits erwähnten Vorteile wie die höhere Messgeschwindigkeit und Genauigkeit bei der Identifikation von Zell-Subpopulationen, den verminderten Bedarf an Probenmaterial (bei oft ohnehin begrenzt zur Verfügung stehendem Material), die Zeitersparnis durch weniger Messröhrchen oder den Bezug einer größeren Anzahl von Zellcharakteristika auf alle gleichzeitig gemessenen Zellen.¹¹⁸ Die Frage, wie viele Farben für ein FACS-Experiment überhaupt notwendig sind, lässt sich nicht pauschal beantworten, viel mehr kommt es auf die jeweilige Fragestellung an. Im Idealfall wäre es wünschenswert, alle Fragen an einen klinischen Test durch eine Färbung mit allen erforderlichen Antikörpern in nur einem Messröhrchen zweifelsfrei beantworten zu können. In die Praxis umsetzbar ist dieser Gedanke jedoch in den allermeisten Fällen selbst mit einer Verfügbarkeit von zehn Farben nicht, da die Komplexität einer MRD-Bestimmung durch viele Fakten bestimmt wird: Gerade bei der Untersuchung von Leukämien oder auch Lymphomen per Durchflusszytometrie besteht sowohl bei Erstdiagnose als auch bei Follow-Up-Untersuchungen eine Reihe verschiedener Fragen, beispielsweise ob eine Population aberranter Zellen vorhanden ist, welcher Zelllinie diese aberranten Zellen angehören oder ob die gefundenen Aberrationen die Einordnung in ein aktuelles Klassifikationssystem erlauben. Dazu kommt die Tatsache, dass die Identifikation einer Population leukämischer Blasten nicht allein durch das Vorhandensein oder Fehlen, oder einer Über- bzw. Unterexpression bestimmter

Immunphänotypen gekennzeichnet ist, sondern stets mit Proben von gesunden Probanden abgeglichen werden muss. Doch gerade aus diesem Grund ist die Analyse der Zellen von Leukämiepatienten mit Bestimmung der minimalen Resterkrankung eine sehr gute Anwendung für die multi-color-Durchflusszytometrie.¹¹⁸

5.2.2 Grenzen der MRD-Bestimmung per FACS

Neben den oben aufgeführten Möglichkeiten der durchflusszytometrischen Bestimmung der minimalen Resterkrankung sollen nachfolgend die Grenzen der MRD-Bestimmung per FACS diskutiert werden.

Zu Beginn der durchflusszytometrischen Untersuchungen der MRD war die Methode vor allem durch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Antikörper eingeschränkt. In den vergangenen Jahren entstand jedoch eine Vielzahl neuer kommerziell erwerblicher konjugierter Antikörper, dennoch sind längst nicht alle Kombinationen von Antikörpern mit Fluorochromen verfügbar oder selbst herzustellen. Als weiterer Punkt ist das Problem anzuführen, dass für eine korrekte Bestimmung der minimalen Resterkrankung eines Leukämiepatienten stets die bei Diagnosestellung definierten Marker bekannt sein müssen²⁶, damit der aberrante Immunphänotyp auch bei sehr niedriger Frequenz in der MRD-Situation sicher identifiziert werden kann. Die Anzahl der Fälle, bei denen ein MRD-Monitoring überhaupt möglich ist, variiert aufgrund unterschiedlich eingesetzter Antikörperpanels bei Erstdiagnose und unterschiedlich verfügbarer „Templates“ zudem von Labor zu Labor. Ohne die Analyse einer ausreichenden Anzahl an „Templates“ können Subpopulationen normaler Zellen, die Markermuster exprimieren, welche leukämietypischen Markern ähneln, zu falsch positiven Ergebnissen führen.²⁸ Die schon angesprochene Sensitivität der Durchflusszytometrie wird in manchen Studien unter bestimmten Voraussetzungen (exzessive Reinigung des Fluidiksystems und Untersuchung einer Gesamtzellzahl von mindestens 10^7 Zellen) mit 1×10^{-6} und somit als vergleichbar mit der Sensitivität der PCR angegeben,^{54,93} erreicht unter praktischen Bedingungen jedoch nur Werte um 10^{-4} bis 10^{-5} .²⁶ Dagegen bietet die Durchflusszytometrie den Vorteil der genaueren Quantifizierung auf dem Niveau einzelner Zellen und zudem die

Möglichkeit, lebende von sterbenden oder toten Zellen zu differenzieren. Dennoch kann gerade in Fällen mit einer minimalen Resterkrankung unter der angenommenen Nachweisgrenze daher nicht sicher zwischen einer „negativen“ oder einer gerade nicht mehr detektierbaren MRD-Last differenziert werden. Darüberhinaus spielen technische Artefakte eine wichtige Rolle bei der korrekten Interpretation der durchflusszytometrisch gewonnenen Daten. So können beispielsweise durch Probenkontamination oder Kontamination von Waschlösungen oder des Fluidiksystems falsch positive Ergebnisse auftreten. Derselbe Effekt ist auch durch unspezifische (Fc-)Antikörperbindungen, die unter anderem auch mit der Anzahl verschiedener Antikörper in der Testlösung zusammenhängen, oder einer großen Zahl von Zell-„debris“ denkbar. Falsch negative Resultate können durch Fehler beim Pipettieren der Antikörper, durch instabile Antikörper (beispielsweise durch falsche Lagerung oder herstellungstechnisch bedingt) oder durch Verwendung eines anderen Probenmaterials (zum Beispiel von peripherem Blut statt Knochenmark) entstehen. Wir versuchten diesen Fehlern durch regelmäßige Reinigung des Fluidiksystems, steriler Filtration von Wasch- und Pufferlösungen, intensives Spülen mit PBS, auch zwischen den einzelnen Teströhrchen und Abwischen der Ansaugnadel mit speziellen Tüchern (Vermeidung von „carry over“) wie von Campana et al. beschrieben²⁶ entgegenzuwirken. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, setzen wir „rabbit“-IgG ein wie im Methodenteil ausführlich beschrieben.

Über diese technischen Artefakte hinaus entsteht bei einem Teil der ALL-Patienten ein sogenannter „lineage switch“ im Verlauf der Erkrankung, welcher mittels Durchflusszytometrie primär nicht erfasst werden kann. Damit ist beispielsweise die Entstehung einer AML nach behandelter ALL gemeint, bei der partiell karyotypische oder molekulare Merkmale des primären Blastenklons der ALL erhalten bleiben können.^{10,47,101} Derartige Verläufe können zwar einfach mit molekularen Methoden wie PCR nachgewiesen werden, entziehen sich aber dem durchflusszytometrischen Nachweis. In diesem Zusammenhang muss neben „lineage switches“ auch kurz das Prinzip von „immunophenotypic shifts“ diskutiert werden. Darunter versteht man grundsätzlich das Verschwinden von Markern im Verlauf der Erkrankung, die bei der Erstdiagnose als auffällig defi-

niert wurden, wie es schon in frühen Untersuchungen vorbeschrieben ist.^{13,52,70} Ursächlich diskutiert wird eine klonale Evolution der Blasten, ein Phänomen, das in der Folge ebenfalls in falsch negativen Ergebnissen von MRD-Analysen durch FACS resultieren kann. In weiteren Studien konnte „immunophenotypic shift“ sowohl bei (CD-)Oberflächen-Antigenen⁸⁹ als auch bei intrazellulären Antigenen wie TdT⁸⁹ und HLA-DR-Antigenen¹ nachgewiesen werden. Dieses Phänomen ist nicht nur bei der ALL, sondern auch für die AML beschrieben.¹⁰⁴ Van Wering et al. untersuchten 1995 insgesamt 40 Fälle von kindlichen Patienten mit ALL zum Zeitpunkt von Erstdiagnose und Rezidiv und fanden eine Häufigkeit von etwa zwei Dritteln für das Auftreten von „immunophenotypic shifts“.¹¹⁵ Leider lassen sich die Auswirkungen von „immunophenotypic shifts“ nur schwer voraussagen; anzunehmen ist jedoch, dass es eine Relation zur Anzahl der im Follow-Up untersuchten Marker geben muss (je mehr Marker verfolgt werden, desto geringer die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse aufgrund des Verschwindens einzelner Marker).²⁶

5.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt die Umsetzung durchflusszytometrischer MRD-Messungen bei der kindlichen ALL von etablierten Analysen mittels eines 4-Farben-Durchflusszytometers auf ein Gerät, das die Messung von mehr als zehn Farben gleichzeitig ermöglicht. Der Weg dieses Transfers und die Anwendung der multi-color-Durchflusszytometrie auf die Bestimmung der minimalen Resterkrankung wird an der detaillierten Analyse und Auswertung von insgesamt sechs Knochenmarkproben von zwei Patienten veranschaulicht, die Ergebnisse obenstehend diskutiert. Dennoch sind für eine Verbesserung und die geplante klinische Anwendung der Methode weitere Messungen eines geeigneten Patientenkollektivs und empirische Vergleiche mit etablierten Standardmethoden notwendig. Dazu gehört auch die Aufnahme weiterer sogenannter „Templates“, d.h. Analysen der Expression von Immunphänotypen auf Zellen gesunden oder regenerierenden Knochenmarks, in die Auswertungsmasken, um auch unklare Messergebnisse besser interpretieren zu können, sowie die Erweiterung oder Optimierung der eingesetzten Laser, Filter und Fluorochrome.

Ferner ist geplant, die oben erwähnten HLA-basierten MRD-Messungen für schwierig nachzuverfolgende Patienten am LSR II weiterzuentwickeln.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen erfolgten bislang lediglich für Proben von B-ALL-Patienten. Dies ist zwar die häufigste Leukämieform bei Kindern, zukünftig soll die Anwendbarkeit der Methode jedoch auch auf Zellmaterial anderer Diagnosen wie beispielsweise einer AML oder T-ALL überprüft werden.

6 Zusammenfassung

Für Patienten mit akuten Leukämien konnte nachgewiesen werden, dass bei Diagnosestellung rund 10^{12} maligne Zellen verteilt im Knochenmark und peripheren Blut vorhanden sein können. Selbst Patienten in vollständiger klinischer Remission können jedoch noch immer bis zu 10^{10} neoplastische Zellen besitzen, die mit morphologischen Methoden (z.B. Knochenmarkausstrich) allein nicht detektierbar sind. Im Rahmen von Untersuchungen der minimalen Resterkrankung (MRD) werden diese Zellen, welche für die Persistenz einer Leukämie und die Entstehung von Rezidiven verantwortlich gemacht werden, näher charakterisiert und beschrieben. Dabei zeigte sich, dass mit einer größeren MRD-Last ein höheres Risiko eines ungünstigen Krankheitsverlaufs assoziiert ist. Neben der etwas länger etablierten Methode des MRD-Nachweises durch PCR-Techniken wurde in den vergangenen Jahren vermehrt die MRD-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für die beiden konkurrierenden Methoden wurden in mehreren Studien konkordante Ergebnisse nachgewiesen, die PCR scheint jedoch in der Praxis den Vorteil einer höheren Sensitivität zu bieten, wogegen die Durchflusszytometrie eine breitere Verfügbarkeit, die schnellere Durchführung und Aussagen auf dem Niveau einzelner Zellen erlaubt.

Studienziel dieser Arbeit war neben der Optimierung der bereits etablierten MRD-Messung am vorhandenen 4-Farben-Durchflusszytometer die Etablierung der Methode auf das multi-color-Durchflusszytometer von BD Biosciences mit 4 Lasern, um so die bislang durch die maximale Anzahl gleichzeitig messbarer Farben begrenzten Möglichkeiten der Methode zu erweitern. Schließlich sollten exemplarisch vergleichende Messungen an klinischen Patientenproben durchgeführt werden, um die MRD-Bestimmung mit zehn und mehr Farben gegenüber der bisherigen Methode mit vier Farben zu evaluieren.

Zur Optimierung der bisherigen Messungen entwickelten wir einen neuen Auswertungsalgorithmus zur genaueren Aufreinigung und somit zur besseren Differenzierung potentieller Blasten von negativen Zellen oder Zelltrümmern. Dazu war es primär notwendig, gesundes bzw. regenerierendes Knochenmark ge-

sunder Kinder systematisch zu analysieren. Beim Transfer der Messungen auf das neue Durchflusszytometer erfolgte zunächst die technische Aufrüstung des Geräts und anschließend die Entwicklung eines aussagekräftigen Vitalitätstests mit reaktiven Farbstoffen, um die Analysen auf vitale Zellen fokussieren zu können. Schließlich galt es, eine sinnvolle und praktikable Kombination bzw. Verteilung der in jedem Messröhrchen benötigten Antikörper auf die zur Verfügung stehenden Kanäle zu finden, was wir durch die Definition eines 10-Farben-Backbones aus CD10/CD38/CD34/CD45/CD56/CD3/CD14/CD19/CD16/AF350 für die B-Linien-ALL erreichten. Nach Einführung neuer Gating-Strategien demonstrierten wir abschließend die Messergebnisse von insgesamt sechs Knochenmarkproben zweier ALL-Patienten jeweils zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zwei Zeitpunkten im weiteren klinischen Verlauf. Die Ergebnisse wurden in Vergleich zu den zuvor am 4-Farben-Durchflusszytometer bestimmten Werten gesetzt und fielen konkordant aus. Diese Arbeit legt den Grundstein für weitere, systematische Analysen von Patientenproben unter Ausnutzung der durch das erweiterte Panel synchron einsetzbarer Marker und der aus der größeren Informationsdichte resultierenden höheren Sensitivität.

7 Literaturverzeichnis

1. Abshire TC, Buchanan GR, Jackson JF, Shuster JJ, Brock B, Head D, Behm F, Crist WM, Link M, Borowitz M, et al.: Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and relapse: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK 6: S. 357-362, 1992.
2. Ahlers J. Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung akuter kindlicher Leukämien. Dissertation: Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 2009.
3. Ahmed F. Role of the ABC transporter ABCG2 in human haematopoiesis. Dissertation: Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2007.
4. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, Steward CG, Handgretinger R, Beck JF, Klingebiel T: Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia* 16: S. 1668-1672, 2002.
5. Bader P, Holle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J: Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer research* 16: S. 1759-1763, 1996.
6. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sule N, Mrozek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 97: S. 3574-3580, 2001.
7. Balduzzi A, Gaipa G, Bonanomi S, Dassi M, Perseghin P, Buscemi F, D'Aniello E, Rovelli A, Schiro R, Longoni D, Rambaldi A, Uderzo C, Biondi A: Purified autologous grafting in childhood acute lymphoblastic leukemia in second remission: evidence for long-term clinical and molecular remissions. *Leukemia* 15: S. 50-56, 2001.
8. Baumgarth N, Roederer M: A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods* 243: S. 77-97, 2000.
9. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH: Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood* 79: S. 1011-1016, 1992.
10. Beishuizen A, Verhoeven MA, van Wering ER, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ: Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood* 83: S. 2238-2247, 1994.
11. Bjorklund E, Gruber A, Mazur J, Martensson A, Hansson M, Porwit A: CD34+ cell subpopulations detected by 8-color flow cytometry in bone marrow and in peripheral blood stem cell collections: application for MRD detection in leukemia patients. *Int J Hematol* 90: S. 292-302, 2009.

12. Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, van der Velden VH, Langerak AW, Vandekerckhove P, van Dongen JJ: Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16: S. 368-375, 2002.
13. Borella L, Casper JT, Lauer SJ: Shifts in expression of cell membrane phenotypes in childhood lymphoid malignancies at relapse. *Blood* 54: S. 64-71, 1979.
14. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, Linda S, Martin PL, Pullen DJ, Viswanatha D, Willman CL, Winick N, Camitta BM: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111: S. 5477-5485, 2008.
15. Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol Suppl* 5: S. 9-15, 1976.
16. Bradstock KF, Janossy G, Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Llewellyn P, Prentice HG, Bollum FJ: Immunofluorescent and biochemical studies of terminal deoxynucleotidyl transferase in treated acute leukaemia. *Br J Haematol* 47: S. 121-131, 1981.
17. Bradstock KF, Janossy G, Pizzolo G, Hoffbrand AV, McMichael A, Pilch JR, Milstein C, Beverley P, Bollum FJ: Subpopulations of normal and leukemic human thymocytes: an analysis with the use of monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 65: S. 33-42, 1980.
18. Bradstock KF, Janossy G, Tidman N, Papageorgiou ES, Prentice HG, Willoughby M, Hoffbrand AV: Immunological monitoring of residual disease in treated thymic acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 5: S. 301-309, 1981.
19. Bradstock KF, Papageorgiou ES, Janossy G, Hoffbrand AV, Willoughby ML, Roberts PD, Bollum FJ: Detection of leukaemic lymphoblasts in CSF by immunofluorescence for terminal transferase. *Lancet* 1: S. 1144, 1980.
20. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, Neoh SH, Sykes PJ, Seshadri R, Toogood I, Waters K, Tauro G, Ekert H, et al.: Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 343: S. 196-200, 1994.
21. Bruce WR, Meeker BE: Comparison of the sensitivity of hematopoietic colony-forming cells in different proliferative states to 5-fluorouracil. *J Natl Cancer Inst* 38: S. 401-405, 1967.
22. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, Del Poeta G, Del Principe MI, Cox MC, Panetta P, Consalvo MI, Mazzone C, Neri B, Ottaviani L, Fraboni D, Tamburini A, Lo-Coco F, Amadori S, Venditti A: The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20: S. 1783-1789, 2006.
23. Campana D: Status of minimal residual disease testing in childhood haematological malignancies. *Br J Haematol* 143: S. 481-489, 2008.
24. Campana D: Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 121: S. 823-838, 2003.

25. Campana D, Coustan-Smith E: Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 15: S. 1-19, 2002.
26. Campana D, Coustan-Smith E: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38: S. 139-152, 1999.
27. Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G: The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 76: S. 163-171, 1990.
28. Campana D, Pui CH: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85: S. 1416-1434, 1995.
29. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G: The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol* 138: S. 648-655, 1987.
30. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suciu 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* 339: S. 591-598, 1998.
31. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C: Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lymphomyeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: S. 9836-9841, 1997.
32. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, Campana D: Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 351: S. 550-554, 1998.
33. Coustan-Smith E, Gajjar A, Hijjiya N, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Andreansky M, Hancock ML, Pui CH, Campana D: Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* 18: S. 499-504, 2004.
34. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Razzouk BI, Pui CH, Pounds S, Andreansky M, Behm FG, Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Campana D: Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 123: S. 243-252, 2003.
35. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D: Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: S. 52-58, 2002.
36. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, Sandlund JT, Rivera GK, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Pui CH, Campana D: Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96: S. 2691-2696, 2000.
37. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M: Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nature medicine* 9: S. 112-117, 2003.

38. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G, Gadner H: Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99: S. 1952-1958, 2002.
39. Ebinger M. Mündliche Mitteilung, 2009.
40. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyermann B, Pogodda M, Proba J, Henze G: Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 358: S. 1239-1241, 2001.
41. Engel H, Goodacre A, Keyhani A, Jiang S, Van NT, Kimmel M, Sanchez-Williams G, Andreeff M: Minimal residual disease in acute myelogenous leukaemia and myelodysplastic syndromes: a follow-up of patients in clinical remission. *Br J Haematol* 99: S. 64-75, 1997.
42. Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, Kruger W, Zabelina T, Dudina O, Finckenstein FG, Kroger N, Kabisch H, Hochhaus A, Zander AR: Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 10: S. 419-425, 2001.
43. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schafer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJ, Biondi A, Bartram CR: Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22: S. 771-782, 2008.
44. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177: S. 452-454, 1956.
45. Fuehrer M, Gerusel-Bleck M, Konstantopoulos N, Bender-Goetze C, Walther JU: FISH analysis of native smears from bone marrow and blood for the monitoring of chimerism and clonal markers after stem cell transplantation in children. *Int J Mol Med* 15: S. 291-297, 2005.
46. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17: S. 2318-2357, 2003.
47. Gagnon GA, Childs CC, LeMaistre A, Keating M, Cork A, Trujillo JM, Nellis K, Freireich E, Stass SA: Molecular heterogeneity in acute leukemia lineage switch. *Blood* 74: S. 2088-2095, 1989.
48. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, Bugarin C, Veltroni M, Michelotto B, Ratei R, Coliva T, Valsecchi MG, Biondi A, Dworzak MN: Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 19: S. 49-56, 2005.
49. Gökbuget N, Ganser A, Schlenk RF. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie http://www.dgho.de/cmsdata/file/file_136.pdf, 2005.

50. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP: Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3: S. 1337-1345, 1997.
51. Goulden N, Bader P, Van Der Velden V, Moppett J, Schilham M, Masden HO, Krejci O, Kreyenberg H, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, Van Dongen J: Minimal residual disease prior to stem cell transplant for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 122: S. 24-29, 2003.
52. Greaves M, Paxton A, Janossy G, Pain C, Johnson S, Lister TA: Acute lymphoblastic leukaemia associated antigen. III ALterations in expression during treatment and in relapse. *Leukemia research* 4: S. 1-14, 1980.
53. Groeneveld K, te Marvelde JG, van den Beemd MW, Hooijkaas H, van Dongen JJ: Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes. *Leukemia* 10: S. 1383-1389, 1996.
54. Gross HJ, Verwer B, Houck D, Recktenwald D: Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry. *Cytometry* 14: S. 519-526, 1993.
55. Hooijkaas H, Hahlen K, Adriaansen HJ, Dekker I, van Zanen GE, van Dongen JJ: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-positive cells in cerebrospinal fluid and development of overt CNS leukemia: a 5-year follow-up study in 113 children with a TdT-positive leukemia or non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 74: S. 416-422, 1989.
56. Horvatinovich JM, Sparks SD, Borowitz MJ: Detection of terminal deoxynucleotidyl transferase by flow cytometry: a three color method. *Cytometry* 18: S. 228-230, 1994.
57. Jacobson LO, Marks EK, et al.: The role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 70: S. 740-742, 1949.
58. Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF, Ashley J: Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood* 56: S. 430-441, 1980.
59. Janossy G, Bollum FJ, Bradstock KF, McMichael A, Rapson N, Greaves MF: Terminal transferase-positive human bone marrow cells exhibit the antigenic phenotype of common acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol* 123: S. 1525-1529, 1979.
60. Janossy G, Hoffbrand AV, Greaves MF, Ganeshaguru K, Pain C, Bradstock KF, Prentice HG, Kay HE, Lister TA: Terminal transferase enzyme assay and immunological membrane markers in the diagnosis of leukaemia: a multiparameter analysis of 300 cases. *Br J Haematol* 44: S. 221-234, 1980.
61. Kaatsch P. Deutsches Kinderkrebsregister <http://www.kinderkrebsregister.de/>, Mainz, 2008.
62. Kerst G. Mündliche Mitteilung, 2009.
63. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, Campana D, Koscielniak E, Niemeyer C, Schlegel PG, Muller I, Niethammer D, Bader P: Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 128: S. 774-782, 2005.

64. Knapp W, Strobl H, Majdic O: Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 18: S. 187-198, 1994.
65. Knechtli CJ, Goulden NJ, Hancock JP, Grandage VL, Harris EL, Garland RJ, Jones CG, Rowbottom AW, Hunt LP, Green AF, Clarke E, Lankester AW, Cornish JM, Pamphilon DH, Steward CG, Oakhill A: Minimal residual disease status before allogeneic bone marrow transplantation is an important determinant of successful outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 92: S. 4072-4079, 1998.
66. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, Schilham MW, Lankester A, Revesz T, Klingebiel T, van Dongen JJ: Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: a report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant* 32: S. 849-851, 2003.
67. Kröger N, Zander A. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. Bremen: S. 6, 2004.
68. Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M, Hrusak O, Mejstrikova E, Griesinger F, Zimmermann M, Reinhardt D: Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 24: S. 3686-3692, 2006.
69. Lapointe C, Forest L, Lussier P, Busque L, Lagace F, Perreault C, Roy DC, Gyger M: Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Bone marrow transplantation* 17: S. 1143-1148, 1996.
70. Lauer S, Piaskowski V, Camitta B, Casper J: Bone marrow and extramedullary variations of cell membrane antigen expression in childhood lymphoid neoplasias at relapse. *Leukemia research* 6: S. 769-774, 1982.
71. Lo-Coco F, Ammatuna E: Front line clinical trials and minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 313: S. 145-156, 2007.
72. Loffler H: Morphology, immunology, cytochemistry, and cytogenetics and the classification of subtypes in AML. *Haematol Blood Transfus* 33: S. 239-242, 1990.
73. Makinodan T: Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 92: S. 174-179, 1956.
74. Malec M, Bjorklund E, Soderhall S, Mazur J, Sjogren AM, Pisa P, Bjorkholm M, Porwit-MacDonald A: Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 15: S. 716-727, 2001.
75. Malec M, van der Velden VH, Bjorklund E, Wijkhuijs JM, Soderhall S, Mazur J, Bjorkholm M, Porwit-MacDonald A: Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 18: S. 1630-1636, 2004.

76. Marcucci G, Caligiuri MA, Dohner H, Archer KJ, Schlenk RF, Dohner K, Maghraby EA, Bloomfield CD: Quantification of CBFbeta/MYH11 fusion transcript by real time RT-PCR in patients with INV(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15: S. 1072-1080, 2001.
77. Moore KA, Lemischka IR: Stem cells and their niches. *Science* 311: S. 1880-1885, 2006.
78. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL: The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: S. 35-71, 1995.
79. Morrison SJ, Weissman IL: The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1: S. 661-673, 1994.
80. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, Campana D: Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: S. 934-938, 2004.
81. Nowak R, Oelschlaegel U, Schuler U, Zengler H, Hofmann R, Ehninger G, Andreeff M: Sensitivity of combined DNA/immunophenotype flow cytometry for the detection of low levels of aneuploid lymphoblastic leukemia cells in bone marrow. *Cytometry* 30: S. 47-53, 1997.
82. Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL: Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res* 16: S. 258-261, 1956.
83. Ogawa M: Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 30: S. 3-6, 2002.
84. Palka G, Stuppia L, Di Bartolomeo P, Morizio E, Peila R, Franchi PG, Calabrese G: FISH detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* 17: S. 231-236, 1996.
85. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, Roederer M: Amine reactive dyes: an effective tool to discriminate live and dead cells in polychromatic flow cytometry. *J Immunol Methods* 313: S. 199-208, 2006.
86. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M: Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature reviews Immunology* 4: S. 648-655, 2004.
87. Pizzolo G, Vincenzi C, Nadali G, Veneri D, Vinante F, Chilosi M, Basso G, Connelly MC, Janossy G: Detection of membrane and intracellular antigens by flow cytometry following ORTHO PermeaFix fixation. *Leukemia* 8: S. 672-676, 1994.
88. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJ: Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: S. 110-118, 1999.
89. Pui CH, Raimondi SC, Head DR, Schell MJ, Rivera GK, Mirro J, Jr., Crist WM, Behm FG: Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse. *Blood* 78: S. 1327-1337, 1991.

90. Ravandi F, Estrov Z: Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* 12: S. 340-344, 2006.
91. Rieger M, Schröder T: Hämatopoetische Stammzellen. *BIOspektrum* 3: S. 254-257, 2007.
92. Roederer M: Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45: S. 194-205, 2001.
93. Rosenblatt JI, Hokanson JA, McLaughlin SR, Leary JF: Theoretical basis for sampling statistics useful for detecting and isolating rare cells using flow cytometry and cell sorting. *Cytometry* 27: S. 233-238, 1997.
94. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzalez M, Orfao A: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98: S. 1746-1751, 2001.
95. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV: A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification. *Cytometry* 12: S. 279-285, 1991.
96. Schumm M, Feuchtinger T, Pfeiffer M, Hoelle W, Bethge W, Ebinger M, Kuci S, Handgretinger R, Lang P: Flow cytometry with anti HLA-antibodies: a simple but highly sensitive method for monitoring chimerism and minimal residual disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 39: S. 767-773, 2007.
97. Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA, Gerbing RB, Bernstein ID, Smith FO, Arceci RJ, Woods WG, Loken MR: Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 101: S. 3398-3406, 2003.
98. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE: The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 62: S. 327-336, 1963.
99. Sitzmann FC, Bartmann P. Pädiatrie. 3. Auflage. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart: S. 486-496, 2007.
100. Slaper-Cortenbach IC, Admiraal LG, Kerr JM, van Leeuwen EF, von dem Borne AE, Tetteroo PA: Flow-cytometric detection of terminal deoxynucleotidyl transferase and other intracellular antigens in combination with membrane antigens in acute lymphatic leukemias. *Blood* 72: S. 1639-1644, 1988.
101. Stass S, Mirro J, Melvin S, Pui CH, Murphy SB, Williams D: Lineage switch in acute leukemia. *Blood* 64: S. 701-706, 1984.
102. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ: Minimal residual disease in leukaemia patients. *Lancet Oncol* 2: S. 409-417, 2001.
103. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ: Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of

- stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 99: S. 2315-2323, 2002.
104. Thomas X, Campos L, Archimbaud E, Shi ZH, Treille-Ritouet D, Anglaret B, Fiere D: Surface marker expression in acute myeloid leukaemia at first relapse. *British journal of haematology* 81: S. 40-44, 1992.
105. Tobal K, Newton J, Macheta M, Chang J, Morgenstern G, Evans PA, Morgan G, Lucas GS, Liu Yin JA: Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 95: S. 815-819, 2000.
106. Turkiewicz D, Gorczynska E, Toporski J, Kalwak K, Rybka B, Noworolska D, Boguslawska-Jaworska J, Chybicka A: Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes. *Leukemia research* 27: S. 993-998, 2003.
107. Uzunel M, Mattsson J, Jaksch M, Remberger M, Ringden O: The significance of graft-versus-host disease and pretransplantation minimal residual disease status to outcome after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 98: S. 1982-1984, 2001.
108. van der Velden VH, Bruggemann M, Hoogeveen PG, de Bie M, Hart PG, Raff T, Pfeifer H, Luschen S, Szczepanski T, van Wering ER, Kneba M, van Dongen JJ: TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia* 18: S. 1971-1980, 2004.
109. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ: Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 21: S. 604-611, 2007.
110. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17: S. 1013-1034, 2003.
111. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER, Lankester AW, van Dongen JJ, Hoogerbrugge PM: Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15: S. 1485-1487, 2001.
112. van Dongen JJ, Breit TM, Adriaansen HJ, Beishuizen A, Hooijkaas H: Detection of minimal residual disease in acute leukemia by immunological marker analysis and polymerase chain reaction. *Leukemia* 6 Suppl 1: S. 47-59, 1992.
113. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Diaz MG, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13: S. 1901-1928, 1999.

114. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352: S. 1731-1738, 1998.
115. van Wering ER, Beishuizen A, Roeffen ET, van der Linden-Schrevel BE, Verhoeven MA, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ: Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9: S. 1523-1533, 1995.
116. Varmus HE, Padgett T, Heasley S, Simon G, Bishop JM: Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA. *Cell* 11: S. 307-319, 1977.
117. Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, Del Poeta G, Mazzone C, Tamburini A, Del Principe MI, Consalvo MI, De Fabritiis P, Cudillo L, Picardi A, Franchi A, Lo-Coco F, Amadori S: Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 17: S. 2178-2182, 2003.
118. Wood B: 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 130: S. 680-690, 2006.
119. Zeng F, Chen M, Katsumata M, Huang W, Gong Z, Hu W, Qian H, Xiao Y, Ren Z, Huang S: Identification and characterization of engrafted human cells in human/goat xenogeneic transplantation chimerism. *DNA Cell Biol* 24: S. 403-409, 2005.
120. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, Dalton V, McBride KD, Sallan SE, Silverman LB, Gribben JG: Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 110: S. 1607-1611, 2007.

8 Anhang

8.1 Messplanungsformulare

MRD-Probenblatt

Name, Vorname:	UPN:
Geburtsdatum:	Proben-Nr.
Diagnose:	
Datum Ersterkrankung:	
Datum des letzten Rezidivs:	Rezidiv Nr.

Datum der Probenentnahme:
Datum des Probeneingangs:
Probenart: <input type="checkbox"/> Knochenmark <input type="checkbox"/> peripheres Blut <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> EDTA <input type="checkbox"/> Heparin
Protokoll: Tag:
<input type="checkbox"/> Z. vor SZT <input type="checkbox"/> Z. nach SZT Tag +

Gesamt-Zellzahl: x 10⁶ aus ml Material

Zellzahl für MRD-FACS: x 10⁶ Zellzahl für Templates: x 10⁶

Zellzahl z. Einfrieren in DMSO: x 10⁶, in Vials à x 10⁶ Zellen

Nr.	AK-Kombination (Calibur)	Anzahl total events	Anzahl Lineage	Blasten
1	58-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			
2	66c-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			
3	IgG1-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			
4	<u>IdI</u> -FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			
5	A2 ²⁸ -FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			
6	IgG2a-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC			

Nr.	AK-Kombination (LSR II)	Anzahl Lineage	Blasten
7	58-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC/33-PECy7/45-PB/3-AF700		
8	66c-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC/33-PECy7/45-PB/3-AF700		
9	IgG1-FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC/33-PECy7/45-PB/3-AF700		
10	<u>IdI</u> -FITC/10-PE/34-PerCP/19-APC/33-PECy7/45-PB/3-AF700		

Abb. 8.1: Beispielplanung einer MRD-Messung an beiden Durchflusszytometern
 Extrazelluläre Färbungen sind normal, intrazelluläre unterstrichen und fett formatiert dargestellt.

B-ALL-Probenblatt Erstdiagnose / Rezidiv

Name, Vorname:	UPN:
Geburtsdatum:	Proben-Nr.
Diagnose:	
Datum Ersterkrankung:	Datum Rezidiv:
	Rezidiv Nr.:

Datum der Probenentnahme:
Probenart: <input type="checkbox"/> Knochenmark <input type="checkbox"/> Vollblut <input type="checkbox"/> EDTA <input type="checkbox"/> Heparin
Datum des Probeneingangs:

Gesamt-Zellzahl: x 10⁶ aus ml Material
 Zellzahl für MRD-FACS: x 10⁶
 Zellzahl z. Einfrieren in DMSO: x 10⁶, in Vials à x 10 Zellen

ERSTE FÄRBUNG:

- FITC / PE / PerCP / APC**
- 1 *IgG1 / IgG1 / IgG1 / IgG1*
 - 2 CD38 / CD10 / CD34 / CD19
 - 3 CD13 / CD56
 - 4 CD21 / NG2
 - 5 CD33
 - 6 CD45
 - 7 CD58*
 - 8 CD66c

 - 9 CD22 / CD20
 - 10 CD52
 - 11 *IgG2b*

 - 12 CD15
 - 13 CD65
 - 14 *IgM*

 - 15 **TdT** / CD10 / CD34 / CD19
 - 16 **TdT** / **cu** / CD34 / CD19
 - 17 CD10 / **cu** / CD34 / CD19

ZWEITE FÄRBUNG:

- FITC / PE / PerCP / APC**
- 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27

AK-KOMBINATIONEN für das Follow-up:

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

(* = Isotyp IgG2a)

Abb. 8.2: Markerkombinationen für B-ALL-Erstdiagnosen bzw. Rezidive am FACSCalibur
 Extrazelluläre Färbungen sind normal, intrazelluläre unterstrichen und fett formatiert dargestellt.

T-ALL-Probenblatt Erstdiagnose / Rezidiv

Name, Vorname:	KMT-Labor-Nr.:
Geburtsdatum:	Proben-Nr.:
Diagnose:	
Datum Ersterkrankung:	
Datum Rezidiv:	Rezidiv Nr.:

Datum der Probenentnahme:
Datum des Probeneingangs:
Probenart: <input type="checkbox"/> Knochenmark <input type="checkbox"/> Vollblut
<input type="checkbox"/> Heparin <input type="checkbox"/> EDTA

Gesamt-Zellzahl: x 10⁶ aus ml Material
 Zellzahl für MRD-FACS: x 10⁶
 Zellzahl z. Einfrieren in DMSO: x 10⁶, in Vials à x 10⁶ Zellen

- FITC / PE / PerCP / APC**
- 1 IgG1 / IgG1 / IgG1 / IgG1
 - 2 CD34 / CD56 / CD3 / HLA-DR + CD19 + CD33
 - 3 **IgG1** / CD5 / CD3 / HLA-DR + CD19 + CD33
 - 4 **TdI** / CD5 / CD3 / HLA-DR + CD19 + CD33

AK-KOMBINATIONEN für das Follow-up:	
1
2
3
4
5
6
7

Abb. 8.3: Markerkombinationen für T-ALL-Erstdiagnosen bzw. Rezidive am FACSCalibur
 Extrazelluläre Färbungen sind normal, intrazelluläre unterstrichen und fett formatiert dargestellt.

Template-Erstellung für B-ALL

Name, Vorname:	UPN:
Geburtsdatum:	Proben-Nr.
Diagnose:	
Datum Ersterkrankung:	Datum Rezidiv:
	Rezidiv Nr.:

Datum der Probenentnahme:
Probenart: <input type="checkbox"/> Knochenmark <input type="checkbox"/> Vollblut <input type="checkbox"/> EDTA <input type="checkbox"/> Heparin
Datum des Probeneingangs:

Gesamt-Zellzahl: x 10⁶ aus ml Material
 Zellzahl für MRD-FACS: x 10⁶ Zellzahl für Templates: x 10⁶
 Zellzahl z. Einfrieren in DMSO: x 10⁶, in Vials à x 10⁶ Zellen

10.000 ungated		gated events			
Röhrch./ Datei-Nr.	AK-Kombination	Röhrch./ Datei-Nr.	Anzahl total events	Anzahl CD19	Anzahl Blasten
1	IgG1/CD10/CD34/CD19				
2	CD13/CD10/CD34/CD19				
3	CD21/CD10/CD34/CD19				
4	CD33/CD10/CD34/CD19				
5	CD38/CD10/CD34/CD19				
6	CD45/CD10/CD34/CD19				
7	CD58/CD10/CD34/CD19				
8	CD66c/CD10/CD34/CD19				
9	CD22/CD10/CD34/CD19				
10	IgG2b/CD10/CD34/CD19				
11	CD15/CD10/CD34/CD19				
12	CD65s/CD10/CD34/CD19				
13	IgM/CD10/CD34/CD19				
14	CD10/CD56/CD34/CD19				
15	CD10/NG2/CD34/CD19				
16	CD10/IgG1/CD34/CD19				
17	CD10/ <u>cu</u> /CD34/CD19				
18	CD10/ <u>goat IgG</u> /CD34/CD19				
19	<u>IdI</u> / <u>cu</u> /CD34/CD19				
20	<u>IdI</u> / <u>goat IgG</u> /CD34/CD19				
21	<u>IdI</u> /CD10/CD34/CD19				

Abb. 8.4: Markerkombinationen für B-ALL-Templates am FACSCalibur
 Extrazelluläre Färbungen sind normal, intrazelluläre unterstrichen und fett formatiert dargestellt. Markerreihenfolge wenn nicht näher bezeichnet: FITC/PE/PerCP/APC.

Template-Erstellung für B-ALL

Name, Vorname:	Geburtsdatum:
Diagnose:	Rezidiv Nr.:
Datum Ersterkrankung:	Datum des letzten Rezidivs:
Datum der Probenentnahme:	
Datum des Probeneingangs:	
Probenart: <input type="checkbox"/> Knochenmark <input type="checkbox"/> peripheres Blut <input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> EDTA <input type="checkbox"/> Na-Heparin <input type="checkbox"/> Li-Heparin <input type="checkbox"/> Probe verklumpt: + ++ +++	
Protokoll: Tag:	
<input type="checkbox"/> vor Protokoll <input type="checkbox"/> vor KMT <input type="checkbox"/> nach KMT Tag +	
Gesamt-Zellzahl: x 10 ⁶ aus ml Material	
Zellzahl für MRD-FACS: x 10 ⁶ Zellzahl für Templates: x 10 ⁶	
Zellzahl z. Einfrieren in DMSO: x 10 ⁶ , in Vials à x 10 ⁶ Zellen	

MRD multicolor panel for LSR II

Nr.	FITC	PE	PE-Dy590	PerCP	PE-AF700	PE-Cy7	PB	q605	q800	AF350	q655	APC	AF700	APC-H7
1	CD66c	CD58	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	CD123	CD16	CD19
2	CD13	CD56	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	CD33	CD16	CD19
3	CD21	NG2	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	CD133	CD16	CD19
4	CD65 _s	CD15	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	CD117	CD16	CD19
5	CD22	CD27	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	<u>CD22</u>	<u>CD3</u>	CD19
6	<u>Id1</u>	<u>eu</u>	CD10	C38	-	CD34	CD45	CD56	CD14	✓	CD3	<u>CD79a</u>	<u>CD3</u>	CD19

Abb. 8.5: Markerkombinationen für B-ALL-Templates am LSR II

Extrazelluläre Färbungen sind normal, intrazelluläre unterstrichen und fett formatiert dargestellt.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Verteilung der Malignome im Kindes- und Jugendalter ⁶¹	2
Abb. 1.2: Knochenmarkausstrich bei ALL und AML ⁹⁹	3
Abb. 1.3: Ontogenese hämatopoetischer Zellen aus HSCs ³	10
Abb. 2.1: Altersverteilung der untersuchten B-ALL Erstdiagnosen (n=30)	30
Abb. 3.1: Übersicht der Anregungs- und Emissionsspektren des 488 nm Lasers im FACSCalibur.....	52
Abb. 3.2: Übersicht der Anregungs- und Emissionsspektren des 635 nm Lasers im FACSCalibur.....	53
Abb. 3.3: Konfiguration des blauen (488nm, links) und roten (633nm, rechts) Lasers am LSR II.....	53
Abb. 3.4: Konfiguration des violetten (405nm, links) und UV (325nm, rechts) Lasers am LSR II.....	54
Abb. 3.5: Erste Analyse einer neu diagnostizierten B-ALL	62
Abb. 3.6: Erste Analyse einer neu diagnostizierten B-ALL (Fortsetzung).....	63
Abb. 3.7: CD58 Auswertung (Erstdiagnose) 1/3	64
Abb. 3.8: CD58-Auswertung (Erstdiagnose) 2/3.....	65
Abb. 3.9: CD58-Auswertung (Erstdiagnose) 3/3.....	66
Abb. 3.10: MRD-Auswertung, Bestimmung der debris (Zelltrümmer).....	68
Abb. 3.11: MRD-Auswertung, Gating der CD19 ⁺ -permeabilisierten Zellen (R2)	69
Abb. 3.12: MRD-Auswertung für CD58 1/3.....	70
Abb. 3.13: MRD-Auswertung für CD58 2/3.....	70
Abb. 3.14: MRD-Auswertung für CD58 3/3.....	72
Abb. 3.15: MRD-Verlauf für CD58 (exemplarisch).....	75
Abb. 4.1: Integration physiologischer Kontrollproben (1/2)	77
Abb. 4.2: Integration physiologischer Kontrollproben (2/2)	80
Abb. 4.3: Neue Auswertungsstrategie: Vorauswertung	82
Abb. 4.4: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19 ⁺ /CD34 ⁺ -Zellen (1/2)83	
Abb. 4.5: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19 ⁺ /CD34 ⁺ -Zellen (2/2)84	
Abb. 4.6: Neue Auswertungsstrategien: Analyse der CD19 ⁺ /CD34 ⁻ -Zellen (1/2)	85

Abb. 4.7: Neue Auswertungsstrategie: Analyse der CD19 ⁺ /CD34 ⁻ -Zellen (2/2)	86
Abb. 4.8: HLA-Analyse Tag 62 n. KMT (1/2)	88
Abb. 4.9: HLA-Analyse Tag 62 nach KMT (2/2)	89
Abb. 4.10: HLA-Analyse Tag 109 nach KMT	90
Abb. 4.11: HLA-Analyse Tag 130, 138 und 167 nach KMT	91
Abb. 4.12: HLA-Analyse Tag 187, 201 und 223 nach KMT	92
Abb. 4.13: MRD-Last im Verlauf für HLA-A2/28	93
Abb. 4.14: Häufig eingesetzte Markerkombinationen am FACSCalibur	96
Abb. 4.15: Media/Viability-Test (PBS, Tag 1)	98
Abb. 4.16: Entwicklung einer zunehmenden Population avitaler Zellen (PBS, Tag 1-7)	99
Abb. 4.17: Abnahme der Zellvitalität in unterschiedlichen Media	100
Abb. 4.18: Zellvitalität bezogen auf CD14-negative Zellen in unterschiedlichen Media	100
Abb. 4.19: Antikörper-Titration CD10-PE-Dye590	103
Abb. 4.20: Titrationskurve zu CD10-PE-Dye590	103
Abb. 4.21: Neue Gating-Strategie am LSR II am Beispiel einer B-ALL-MRD-Probe	109
Abb. 4.22: Erstdiagnose Patientin 1 – exprimierte Marker (1/2)	113
Abb. 4.23: Erstdiagnose Patientin 1 – Abgleich mit physiologischem KM (2/2)	114
Abb. 4.24: Erste MRD-Kontrolle Patientin 1 (1/2)	116
Abb. 4.25: Erste MRD-Kontrolle Patientin 1 (2/2)	116
Abb. 4.26: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (1/3)	118
Abb. 4.27: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (2/3)	119
Abb. 4.28: Zweite MRD-Kontrolle Patientin 1 (3/3)	120
Abb. 4.29: Erstdiagnose Patient 2 – exprimierte Marker (1/2)	122
Abb. 4.30: Erstdiagnose Patient 2 – Abgleich mit physiologischem KM (2/2)	123
Abb. 4.31: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (1/3)	125
Abb. 4.32: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (2/3)	126
Abb. 4.33: Erste MRD-Kontrolle Patient 2 (3/3)	126
Abb. 4.34: Zweite MRD-Kontrolle Patient 2 (1/3)	128

Abb. 4.35: Zweite MRD-Kontrolle Patient 2 (2/3).....	129
Abb. 4.36: Zweite-MRD Kontrolle Patient 2 (3/3).....	129
Abb. 8.1: Beispielplanung einer MRD-Messung an beiden Durchflusszytometern	163
Abb. 8.2: Markerkombinationen für B-ALL-Erstdiagnosen bzw. Rezidive am FACSCalibur.....	164
Abb. 8.3: Markerkombinationen für T-ALL-Erstdiagnosen bzw. Rezidive am FACSCalibur.....	165
Abb. 8.4: Markerkombinationen für B-ALL-Templates am FACSCalibur.....	166
Abb. 8.5: Markerkombinationen für B-ALL-Templates am LSR II.....	167

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Formen der akuten lymphatischen Leukämie.....	5
Tab. 1.2: Formen der akuten myeloischen Leukämie.....	7
Tab. 1.3: Auswahl möglicher Anwendungen von MRD-Messungen.....	13
Tab. 2.1: Eingeschlossene Diagnosen	27
Tab. 2.2: Untersuchte Templates am FACSCalibur Durchflusszytometer.....	27
Tab. 2.3: Untersuchte Templates am LSR II Durchflusszytometer.....	28
Tab. 2.4: Diagnosenverteilung der Leukämiepatienten (n=75).....	29
Tab. 2.5: Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien	32
Tab. 2.6: Verwendete Chemikalien.....	33
Tab. 2.7: Stammlösungen und Inhaltsstoffe	34
Tab. 2.8: FITC-konjugierte Antikörper.....	35
Tab. 2.9: PE-konjugierte Antikörper.....	36
Tab. 2.10: PerCP-konjugierte Antikörper	36
Tab. 2.11: APC-konjugierte Antikörper	37
Tab. 2.12: AlexaFluor 488-konjugierte Antikörper	37
Tab. 2.13: AlexaFluor 700-konjugierte Antikörper	37
Tab. 2.14: Pacific Blue-konjugierte Antikörper.....	38
Tab. 2.15: Qdot-konjugierte Antikörper.....	38
Tab. 2.16: Tandem-konjugierte Antikörper	38
Tab. 2.17: HLA-Antikörper	39

Tab. 2.18: Antikörper (Fc-Rezeptor-Blocking)	39
Tab. 2.19: Unkonjugierte Fluorochrome, testweise verwendet zur Lebend/Tot-Differenzierung und Etablierung der Ak-Kombinationen	40
Tab. 2.20: Cytometer-Beads zur Gerätekalibrierung	40
Tab. 2.21: EDV-Software	40
Tab. 3.1: Korrigierte MRD-Auswertung für CD58	74
Tab. 4.1: Eingeschlossene Marker für Kontrollproben.....	81
Tab. 4.2: Ergebnisse der Antikörper-Titrations	105
Tab. 4.3: Ausgeschlossene Antikörper	105
Tab. 4.4: 10-Farben-Backbone (LSR II).....	107

9 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. R. Handgretinger und Herrn Professor Dr. P. Lang bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und die Annahme als Doktorand.

Bei meinem Betreuer Dr. Martin Ebinger möchte ich mich herzlich für die sehr gute Betreuung, die zahlreichen Hilfestellungen und dafür, dass Du auch in schwierigen Zeiten stets hinter mir und unserem Projekt gestanden hast, bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls Dipl.-Biol. Kai Witte für die vielen wertvollen Ratschläge und Antworten auf allerlei große und kleine Fragen und Probleme. Bei Dipl.-Biol. Iris Schäfer möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die zahlreichen gemeinsamen Einsätze an der Pipettierbank und natürlich am FACS, auch spätabends, und für Deine Geduld bedanken. Außerdem gebührt allen Kolleginnen und Kollegen unserer und anderer Arbeitsgruppen sowie den Mitarbeiterinnen des KMT-Labors großer Dank für ein allzeit offenes Ohr, die freundliche Zusammenarbeit sowie auch das Teilen mancher Frustrationserlebnisse.

Ich danke dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät Tübingen für die Aufnahme in das Promotionskolleg und das hilfreiche und thematikübergreifende Ausbildungsprogramm als besonderen Teil dieses Förderprogramms.

Meinen Eltern Anton und Lydia, meiner Schwester Janina und meiner ganzen lieben Familie danke ich neben allen meinen Freunden und Manu von ganzem Herzen für die jahrelange Unterstützung und Begleitung. Tausend Dank für Eure Zeit, Eure Zuwendung und Euren motivierenden Zuspruch, der entscheidend zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen hat.

10 Lebenslauf

Persönliches

Name	Timo Franz Sugg
Geburtsdatum	30. Oktober 1983
Geburtsort	Ravensburg
Eltern	Anton und Lydia Sugg

Ausbildung

1990 - 1994	Grundschule Aulendorf
1994 - 2003	Studienkolleg St. Johann Blönried
2003	Abitur
2004 - 2010	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2009	Promotionskolleg Molekulare Medizin des IZKF Tübingen
26.11.2010	Staatsexamen

Famulaturen

Innere Medizin	Oberschwabenklinik Ravensburg
Anästhesiologie	Universitätsklinikum Tübingen
Pädiatrie	Universitätsklinikum Tübingen
Dermatologie	Hautarztpraxis Dr. Datz, Tübingen
Radio-Onkologie	Kantonsspital Luzern, Schweiz

Praktisches Jahr

Innere Medizin	Universitätsklinikum Tübingen
Wahlfach Radiologie	Universitätsspital Basel, Schweiz
Chirurgie	Kantonsspital Luzern, Schweiz