Molekularbiologie in der Tumordiagnostik: Neue Wege zu Nachweis, Klassifikation und Stadieneinteilung maligner Lymphome

K.		Pfizenmaier ^a
G.A.		Nagel ^b

^aKlinische Arbeitsgruppe der Max-Planck-Gesellschaft «Wirt-Tumor-Interaktionen», Göttingen ^bAbteilung Hämatologie/Onkologie, Zentrum Innere Medizin, Universität Göttingen

Sonderdruckbestellungen an: Dr. K. Pfizenmaier, Klinische Arbeitsgruppe der Max-Planck-Gesellschaft «Wirt-Tumor-Interaktionen», Goßlerstraße 10d, D-3400 Göttingen

In dieser Ausgabe der ONKOLOGIE berichten Kneba et al. [4] an Beispielen über die klinischen Anwendungsmöglichkeiten einer neuen molekularbiologischen Nachweismethode maligner Zellen des lymphatischen Systems. Worum geht es bei diesem Nachweisverfahren des «Gen-Rearrangements», und welches ist sein möglicher klinischer Stellenwert?

Die Diagnosestellung und Klassifizierung von lymphatischen Neoplasien erfolgte bisher durch morphologische, histochemische und immunologische Kriterien. Die Identifizierung neoplastischer Lymphozyten eines frühen Differenzierungsstadiums kann jedoch Schwierigkeiten bereiten, wenn lymphoidzellspezifische Oberflächenantigene oder andere charakteristische Marker fehlen. Auch kann gelegentlich mit diesen konventionellen Verfahren nicht zwischen einer malignen und einer reaktiven Lymphozytenproliferation unterschieden werden. Weiterhin kann der Nachweis des klonalen Ursprungs der Tumorzellen – ein Hauptkriterium der Malignität – in der Regel weder mit morphologischen noch mit histochemischen Methoden erbracht werden. Auch die Immundiagnostik, die seit der allgemeinen Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper wesentliche Fortschritte in der Differenzierung und Subtypisierung vieler Tumoren ermöglicht hat, beantwortet die Frage nach der Klonalität eines Tumors meist nicht. Durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden scheint diese diagnostische Lücke bei B- und T-Zelllymphomen und -Leukämien weitgehend geschlossen werden zu können, da jetzt definitive Aussagen über Dignität (Klonalität) und vorliegenden Zelltyp getroffen werden können.

Grundlage dieses neuen diagnostischen Zugangs ist die Erkenntnis, daß sich B- und T-Lymphozyten schon in einem frühen Entwicklungsstadium sowohl untereinander als auch von anderen Körperzellen durch einen Umbau bestimmter Gene (Gen-Rearrangement) unterscheiden. Es handelt sich hierbei um die Immunglobulin- (Ig) bzw. T-Zellantigenrezeptor- (TZR-) Gene. Diese B- bzw. T-Zellspezifischen Rearrangements der Ig- bzw. TZR-Gene sind Grundlage der praktisch unbegrenzten Diversität des Immunsystems [5, 7]. In der Abbildung ist ein solches Gen-Rearrangement am Beispiel eines Immunglobulin-Gens vom Schwerkettentyp schematisch dargestellt.

Alle B-Vorläuferzellen weisen eine einheitliche, sogenannte Keimbahnkonfiguration (Germ-Line) der Ig-Gene auf. Diese bestehen jeweils aus unterschiedlichen Gruppen von

Gensegmenten, die wieder in sich verschieden sind. Diese Gruppen werden V (Variable), D (Diversity), J (Joining) und C (Constant) bezeichnet. Die einzelnen Gensegmente jeder Gruppe sind durch nicht-kodierende Abschnitte (Introns) voneinander getrennt. Die Immunglobulin-Gene sind in der Keimbahn-anordnung nicht funktionsfähig. Im Laufe der B-Zell-Differenzierung kommt es zu einem Zusammenlagern (Rearrangement) jeweils eines Gensegments aus der V-, D-, J- und C-

123456 lvs C
L Vu
Germ-line
Heavy Chain Gene
DNA

%H*
HHHl-O-
L Vu
a b c x
n
J
DNA Rearrangement
Rearranged
IVS
Heavy Chain Gene Vry/////λ\
Cμ
DNA
L VH b23456

Abb. 1. Rearrangement von Gensegmenten der Keimbahn (Germ-Line) im Laufe der B-Zell-Differenzierung am Beispiel des Schwerekettengens (heavy chain gene) (Abkürzung siehe Text).

Editorial

5

Gruppe durch Deletion aller dazwischen liegenden Genabschnitte. Erst daraus entsteht ein funktionsfähiges Gen, das die Antikörperspezifität determiniert und auf sämtliche Nachkommen der Zellen (Klon) übertragen wird. Bei der Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten ist die individuelle Auswahl und Kombination dieser Gensegmente für einen B-Zellklon absolut spezifisch. Analoge genetische Umbauten der TZR-Gene finden bei T-Lymphozyten statt. Im Falle einer malignen Entartung und der damit einhergehenden klonalen Vermehrung einer neoplastischen Zelle stellt die rearrangierte DNA ein tumorspezifisches Merkmal dar, das sich mit molekularbiologischen Verfahren nachweisen läßt [3, 8]: Rearrangede DNA weist gegenüber der Keimbahn-konfiguration der DNA eine veränderte Nukleotidsequenz und damit ein verändertes Muster an Schnittstellen für sequenzspezifische Endonukleasen (Restriktionsenzyme) auf. Diese Unterschiede lassen sich im Southern-Blot-Verfahren nachweisen, wo nach enzymatischem Verdau der DNA die Größe der entstandenen DNA-Restriktionsfragmente durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Proben sichtbar gemacht wird. Das Bandenmuster dieser Restriktionsfragmente stellt gewissermaßen den Fingerabdruck des betreffenden B-Zellklons dar. T-Zellklone lassen sich analog über

rearrangierte TZR-Gene identifizieren. Hierbei scheint in beiden Fällen die Empfindlichkeit der Methode ausreichend groß, um schon bei einem Anteil von etwa 2% klonaler (= maligner) Zellen innerhalb einer Gewebeprobe einen positiven Befund erheben zu können.

Nach oben Gesagtem stellt sich nun die Frage nach der derzeitigen klinischen Bedeutung dieser neuen und aufwendigen Methodik der Lymphomdiagnostik. Neben dem Nachweis der Klonalität als Marker für Malignität erlauben Untersuchungen von Gen-Rearrangements Aussagen über den betreffenden Zelltyp. Ig- und TZR-Gen-Rearrangements gehen ontogenetisch der Expression funktioneller Genprodukte im Zytoplasma und an der Membran voraus, so daß eine molekulargenetische Analyse serologisch nicht klassifizierbarer Lymphome/Leukämien oft eine klare Zuordnung zur B- und T-Zellreihe ergibt [1–3, 8]. Führen morphologische oder zytochemische Methoden zur eindeutigen Diagnose und Klassifikation des malignen Lymphoms, vermag der Nachweis des Gen-Rearrangements keine weiteren klinisch verwertbaren Informationen zu liefern, da selbst die mögliche Zusatzinformation, wie der Nachweis der Oligoklonalität eines Tumors, das derzeitige klinische, diagnostische und therapeutische Vorgehen nicht beeinflusst. Erlauben die konventionellen Methoden jedoch keine eindeutige Diagnose oder Differentialdiagnose eines T- oder B-Zell-Lymphoms, hilft das hier vorgestellte molekularbiologische Verfahren weiter. Solche «Problemfälle» stellen etwa chronisch rezidivierende Lymphknotenvergrößerungen, isolierte Lymphknotenrezidive bei malignen Lymphomen mit der schwierigen Differentialdiagnostik der «unspezifisch reaktiven Lymphadenitis» oder auch die Lymphomdiagnostik im Knochenmark in der reaktiven Phase nach Chemotherapie dar.

Wie erste Befunde zeigen, kann dieses Verfahren auch beim Staging von Non-Hodgkin-Lymphomen erfolgreich eingesetzt werden, empfindlicher als die herkömmlichen Methoden sein und damit die Chance einer früheren und sicheren Erkennung der Dissemination eines malignen Lymphoms bieten [6]. Dieser frühere Nachweis des Organbefalls mit malignen Zellen wirft allerdings eine neue und nur in prospektiven Studien zu klärende Frage auf, ob der Nachweis maligner Zellen außerhalb des lymphatischen Systems immer einem Stadium IV des malignen Lymphoms entspricht oder aber auch Ausdruck einer nur temporären nicht-metastatischen Besiedelung dieser Organe mit malignen Zellen sein kann.

Literatur

Arnold, A.; Cossman, J.; Bakshi, A.; Jaffe, E. S.; Waldmann, T. A.; Korsmeyer, S. J.: Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. New Engl. J. Med. 309: 1593–1599 (1983).

Bertness, V.; Kirsch, I.; Hollis, G.; Johnson, B.; Bunn, P. A., Jr.: T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. New Engl. J. Med. 313: 534–548 (1985).

Desforges, J. F.: T-cell receptors. New Engl. J. Med. 313: 576–577 (1985).

Kneba, M.; Krieger, G.; Brocke, U.; Bolz, I.; Krönke, M.: Rearrangements von Immunoglobulin- und T-Zell-Antigenrezeptor-Genen als diagnostische Marker bei lymphatischen Neoplasien. Onkologie 9: 6–9 (1986).

Korsmeyer, S. J.; Bakshi, A.; Arnold, A.; Siminovitch, K. A.; Waldmann, T. A.: Genetic rearrangements of human immunoglobulin genes; in Greene, Nisonoff, The biology of idiotypes, pp. 75–95 (Plenum Publ. Corp., New York 1984).

Krönke, M.; Krieger, G.; Kneba, M.; Nagel, G. A.; Pfizenmaier, K.: Clonal rearrangements of T-cell receptor and immunoglobulin genes as marker for bone marrow involvement in Non-Hodgkin's lymphomas. (Submitted for publication.)

Royer, H. D.; Acuto, O.; Fabbi, M. et al.: Genes encoding the β subunit of the antigen/MHC receptor undergo rearrangement during intrathymic ontogeny prior to surface T3-Ti expression. *Cell* 39: 261–266 (1984).

Schwartz

R. S.: From molecular biology to the bedside. The example of immunoglobulin genes. *New Engl. J. Med.* 310: 521–522 (1984).