

Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) gehen zu 90% von B-Lymphozyten und zu 10% von T-Lymphozyten aus. In B-Lymphozyten findet während der Reifung ein Rearrangement des IgH Genlocus statt. Dieser Locus enthält 69 rekombinationsfähige "variable" (V), 30 "diversity" (D) und 6 "joining" (J) Gene. Während des Rearrangements werden je ein V, ein D und ein J Gen in direkte Nachbarschaft gebracht (Abb.1). In gleicher Weise können bei T-Lymphozyten 14 V-Gene und 5 J-Gene des T-Zell Rezeptor γ (TCR- γ) rekombiniert werden. Da diese individuellen Rearrangements in der Entwicklung eines jeden B- oder T-Zell Lymphozyten stattfinden, resultieren normalerweise polyklonale Lymphozytenpopulationen hinsichtlich des IgH- bzw. des TCR- γ -Genes. Ein neoplastischer Prozess ist demgegenüber durch das überproportionale Auftreten eines einzelnen B- (oder T-) Zellklones, d.h. eines bestimmten V(D)J Rearrangements, gekennzeichnet.

Neben diesem allgemeinen Nachweis einer klonalen Proliferation können Mantelzell-Lymphome und Follikuläre Lymphome spezifisch nachgewiesen werden. 55-60% der Mantelzell Lymphome tragen eine t(11;14)(q13;q32), die den IgH-Enhancer in die Nähe des CCND1 (syn.: BCL1) Gens transloziert und so zur Überexpression von CCND1 führt. Follikuläre Lymphome sind zu ca. 70-90% durch eine t(14;18)(q32;q21) gekennzeichnet, die den IgH Locus an das BCL-2 Gen transloziert und letzteres überexprimiert.

Material

- Gewebe (kryo/Paraffin)
- Blut (EDTA/Heparin)
- Knochenmark (EDTA)

Kontrollen

Als interne Kontrolle für die Qualität der Proben-DNA wird in jedem Versuch das β -Globin-Gen (352bp PCR-Produkt) nachgewiesen. Bei hochgradig degradierter DNA (z.B. durch ungeeignete Fixierungsbedingungen der Gewebeprobe) kann der β -Globin-Nachweis nicht mehr geführt werden. In diesem Fall ist auch die Analyse der diagnostischen DNA-Fragmente nicht mehr mit Sicherheit möglich.

Als positiv-Kontrolle für B- und T-Zell Polyklonalität wird in jedem Versuchsansatz DNA aus Thymus-Gewebe mitgeführt. Als positiv-Kontrolle für klonale IgH- und TCR γ -Rearrangements sowie die Translokationen t(11;14) und t(14;18) wird DNA der Zelllinien REC1 (positiv für B-Zell Klonalität und t(11;14)), DOHH (positiv für B-Zell Klonalität und t(14;18)) und JURKAT (biklonal für TCR γ VI und VIII) analysiert.

Als negativ-Kontrolle wird in jedem Versuchsansatz Wasser verwendet.

Testprinzip

Zum gleichzeitigen Nachweis der B-Zell- oder T-Zell-Klonalität und der häufigsten und diagnostisch wichtigsten Translokationen t(11;14) und t(14;18) werden zwei Multiplex-PCR Assays (Assay 1 mit 26 unterschiedlichen PCR-Primern; Assay 2 mit 13 unterschiedlichen PCR-Primern) mit 4-Farben-Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Im Assay 1 wird gleichzeitig auf B-Zell-Klonalität, T-Zell-Klonalität und beide Translokationen untersucht. Assay 2 dient zur Bestätigung und Subtypisierung eines positiven Befundes für T-Zell-Klonalität aus Assay 1.

Drei der vier verwendeten Floreszenzfarbstoffe (Blau, Grün, Gelb, Rot) sind an bestimmte PCR- Primer gekoppelt, so dass im Assay 1 (26 Primer) die PCR-Produkte für IgH und TCR γ durch eine blaue Fluoreszenz, die t(11;14) PCR-Produkte durch eine grüne Fluoreszenz und die t(14;18) Fragmente durch eine gelbe Fluoreszenz charakterisiert sind. Im Assay 2 (13 Primer) sind die drei Farbstoffe den Primern für verschiedene V-Gene des TCRg lokus zugeordnet (siehe Tabelle 1). Mit dem vierten Farbstoff (rot) wird ein Längenmarker markiert. Alle PCR-Produkte und der Längenmarker werden im Anschluss an die PCR in einer Fragmentlängenanalyse ("High Resolution Fragment Analysis" HRFA, "GenScan") anhand der Fragmentgröße und der Fluoreszenzfarbe identifiziert. Zudem werden die PCR-Produkte anhand der Fluoreszenzintensität relativ zueinander quantifiziert.

B-Zell-Klonalität

Zum Klonalitätsnachweis der B-Zellen werden 63 der 69 rekombinationsfähigen IgH V-Gene sowie alle 6 funktionellen IgH J-Gene im PCR-Assay 1 (26 Primer) analysiert. Die verwendeten Primer liegen in den Framework Regionen 1 und 3 (FR1 und FR3) der V-Gene sowie der FR4 Region der J-Gene (Abb. 1). Je nach Rekombination ergeben die FR1/FR4 Primer PCR-Produkte von 300 bp - 400 bp, die FR3/FR4 Primer 80 bp bis 140 bp. Da bei B-Lymphozyten das Rearrangement immer nur auf einem Allel stattfindet (Prinzip der "allelic exclusion"), resultiert aus jedem einzelnen B-Zell-Klon je ein einzelnes PCR-Produkt für FR1-J und FR3-J.

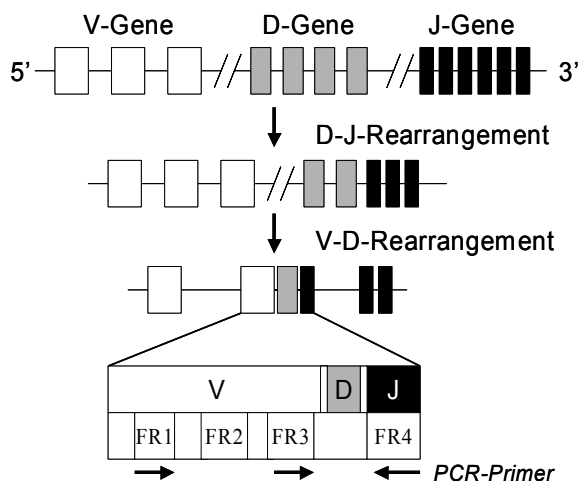


Abb.1: Rearrangement des IgH Genlocus (Chr. 14q32) bei B-Lymphozyten. Durch den Einsatz von Konsensus-Primern in den Framework Regionen können über 90% der möglichen Rearrangements detektiert werden.

T-Zell Klonalität

Nach demselben vorstehenden Prinzip werden zum Klonalitätsnachweis der T-Zellen 18 der insgesamt 19 (14 V und 5 J) Gene des TCR- γ Locus (Chr. 7p15) im Assay 1 (26 Primer) analysiert. Bei T-Lymphozyten findet das TCR γ -Rearrangement häufig auf beiden Allelen statt. Daher können in einem T-Zellklon (im Gegensatz zu B-Lymphozyten) in vielen Fällen zwei PCR-Produkte nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Analyse der B-Zell-Klonalität ist für den sicheren Nachweis der T-Zell-Klonalität ein zweiter PCR Assay (Assay 2) notwendig.

Im Assay 1 weisen die einzelnen Amplifikate (zwischen 180 bp und 280 bp) z.T. nur sehr geringfügige Längenunterschiede auf. Die exzellente Auflösung der HFRA ermöglicht zwar in den meisten Fällen die sichere Darstellung eines klonalen Rearrangements, ist jedoch ein starker Hintergrund von polyklonalen T-Zellen vorhanden, können der (die) Peak(s) des klonalen Rearrangements verdeckt werden. Aus diesem Grund wird parallel zu Assay 1 eine TCR γ -spezifische PCR (Assay 2) durchgeführt. Assay 2 ist eine 4-Farben-multiplex seminested PCR mit 13 verschiedenen Primern, wobei die sichere Unterscheidung der verschiedenen Gruppen von V-J Sequenzen durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der PCR-Amplifikate ermöglicht wird. Gegenüber Assay 1 führt Assay 2 ausserdem zu anderen Fragmentgrößen für die V-Gen-spezifischen PCR-Produkte (Tabelle 1).

TCR γ V- Primer	Fluoreszenzfarbe	Fragmentlängenunterschied
V1-consensus	Grün	+ 34bp
V1S5P	Grün	+ 34bp
V1S1P/7	Grün	+ 34bp
V1S6	Grün	+ 34bp
V5P	Grün	+78bp
V2 n	Gelb	-28bp
V3P n	Blau	-89bp
V4P n	Blau	-55bp
V6P n	Blau	-65bp

Tabelle1: Assay 2 (TCR γ -spezifische PCR). Die verschiedenen TCR γ V Fragmente können anhand der Fluoreszenzmarkierung und des Grössenunterschiedes im Vergleich zu Assay 1 identifiziert werden.

Translokationsbestimmung

Im multiplex-PCR Assay sind Primer für das CCND1 Gen auf Chr. 11, das BCL2-Gen auf Chr. 18 und das IgH Gen auf Chr. 14 enthalten. Nur bei Vorliegen einer 11;14 bzw 14;18 Translokation kann zwischen den Primern für CCND1 und IgH (t(11;14)) bzw. für BCL2 und IgH (t(14;18)) ein charakteristisches PCR-Produkt entstehen (Abb. 2).

Der PCR-Nachweis beider Translokationen kann zu verschiedenen PCR Produktlängen führen, da bei der Ligation der DNA-Stränge eine unbestimmte Zahl von Nukleotiden am Bruchpunkt eingeführt werden können und zudem mehrere unterschiedliche Bruchpunkte existieren. Der Bruchpunkt liegt im Falle der t(14;18) in ca. 70% der Fälle innerhalb der 3' UTR von Exon 3 (major breakpoint region, MBR) und in weiteren ca. 5% weiter distal (in 3') von Exon 3 (minor cluster region, MCR). Bei der t(11;14) ist in ca. 80% der Fälle der "major translocation cluster" (MTC) betroffen. Weitere Bruchpunkte sind ausserhalb dieser Regionen breit verstreut und daher für einen PCR-Nachweis ungeeignet.

Theoretisch könnte der Translokationsnachweis daher bei ca. 70-80% der tatsächlich auftretenden Translokationen erfolgreich sein, in der Praxis werden jedoch vermutlich nur ca. 50% erreicht. Wahrscheinlich ist für diese Limitierung in erster Linie die vergleichsweise schlechtere Qualität von DNA aus formalinfixiertem Gewebe verantwortlich. Zumindest Mantelzell-Lymphome zeigen jedoch zu 100% ein klonales IgH-Rearrangement, sodass der unspezifische Lymphomnachweis in der Regel gelingt. Bei follikulären Lymphomen können jedoch Mutationen des IgH-Lokus auftreten, die auch beim unspezifischen Nachweis zu einem falsch-negativen PCR-Ergebnis führen (in Basel zeigen ca. 30% der t(14;18)-positiven Fälle fälschlicherweise kein klonales IgH-Rearrangement). Ein negativer Ausfall der Translokationsanalyse ist demnach kein Ausschluss eines Mantelzell- oder follikulären Lymphoms!

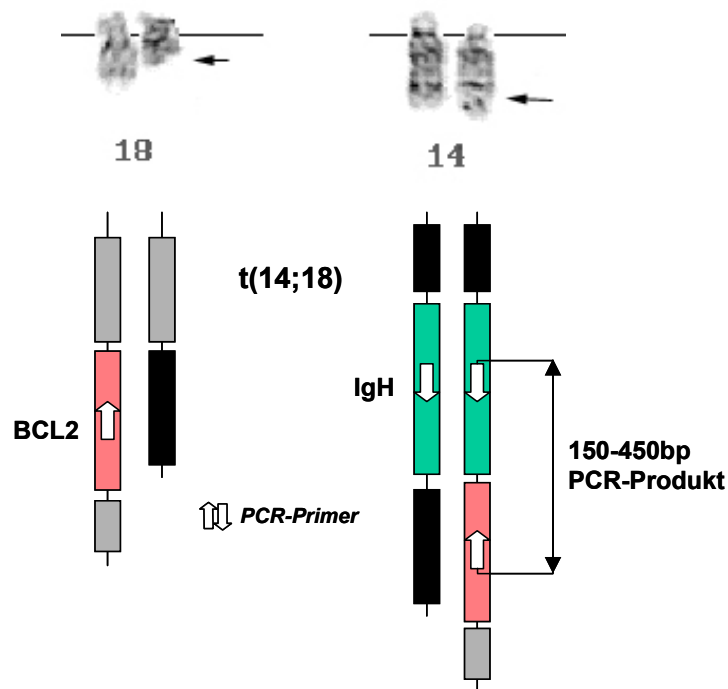


Abb.2: Prinzip des Translokationsnachweises am Beispiel der t(14;18) bei follikulären Lymphomen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Bruchpunkte der t(14;18) auf jeweils einem der Chromosomen 14 und 18 dargestellt (Pfeile). Das Schema zeigt die Anordnung von BCL2 (rot) und IgH (grün) im normalen Chromosom (jeweils links) und als Folge der Translokation. Angrenzende Gene sind für Chromosom 18 in Grau, für Chromosom 14 in Schwarz dargestellt.

Auswertung

Die Produkte des Multiplex-PCR-Ansatzes werden in einer hochauflösenden Fragmentanalyse (Kapillarelektrophorese ("GenScan") mittels ABI 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA) analysiert. Als Ergebnis werden die Größe und relative Menge aller PCR-Produkte dargestellt. Das Prinzip der Ergebnisdarstellung geht aus Abb. 3 hervor. Beispiele von GenScan-Analysen sind in den Abb. 4 und 5 dargestellt.

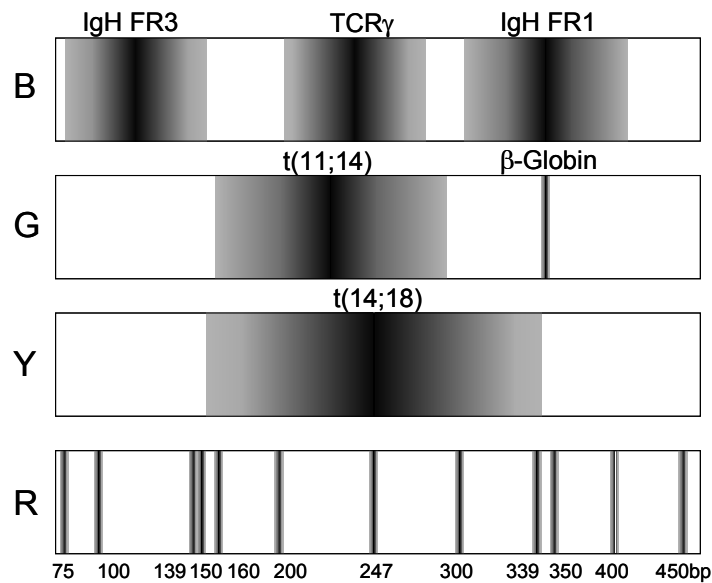


Abb. 3: Schematische Darstellung der möglichen Ergebnisse einer GenScan-Analyse mit der ABI 310 Kapillarelektrophorese. Die unterschiedlichen Reihen stellen die Fluoreszenzfarbkanäle für Blau (B), Grün (G), Gelb (Y) und Rot (R) dar. Die mit blauer Fluoreszenz markierten PCR-Produkte für B-Lymphozyten sind im Bereich von 80-140 bp (IgH Framework Region 3 \rightarrow J) und 300-400 bp (IgH Framework Region 1 \rightarrow J) zu erwarten. Dazwischen werden die TCR γ Fragmente im Bereich 180-280 bp angezeigt. Im grünen Kanal erscheinen das PCR-Produkt der 11;14 Translokation (160-300 bp) und für β -Globin (352 bp). Der gelbe Kanal stellt die t(14;18) bei 150-300 bp dar. Der Längensmarker wird im roten Kanal angezeigt.

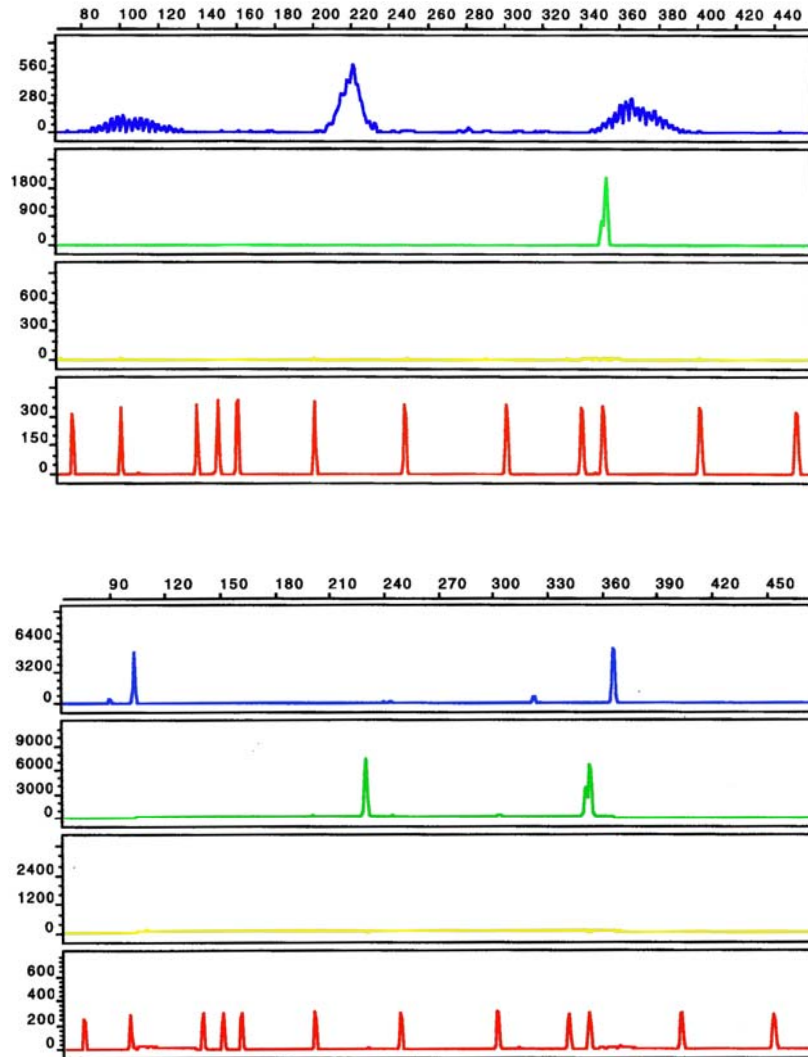


Abb. 4: Beispiele von GeneScan-Analysen.

Oben: Normale Kontrollzellen. Im blauen Kanal sind viele Signale für IgH FR3-J (links) und IgH FR1-J (rechts) sowie für TCR γ (mitte) sichtbar. Jeder Peak entspricht einem PCR-Produkt einer individueller Länge. Dieses Ergebnis zeigt eine polyklonale Population von B- und T-Lymphozyten. Im grünen Kanal ist bei 352 bp der Peak für β -Globin erkennbar, der als Kontrolle für die Qualität der zu untersuchenden DNA dient. Es liegt kein Signal für eine t(11;14) vor. Ebenso zeigt der gelbe Kanal keine t(14;18) an. Im roten Kanal ist der Molekulargewichtsmarker dargestellt.

Unten: GeneScan-Analyse der Zelllinie REC1, die von einem Mantelzell-Lymphom stammt. Die Zelllinie zeigt ein klonales IgH-Rearrangement (Peaks für VFR3-J (103 bp) und VFR1-J (365 bp) im blauen Kanal). Zudem ist im grünen Kanal der Peak für die t(11;14) bei 229 bp zu sehen.

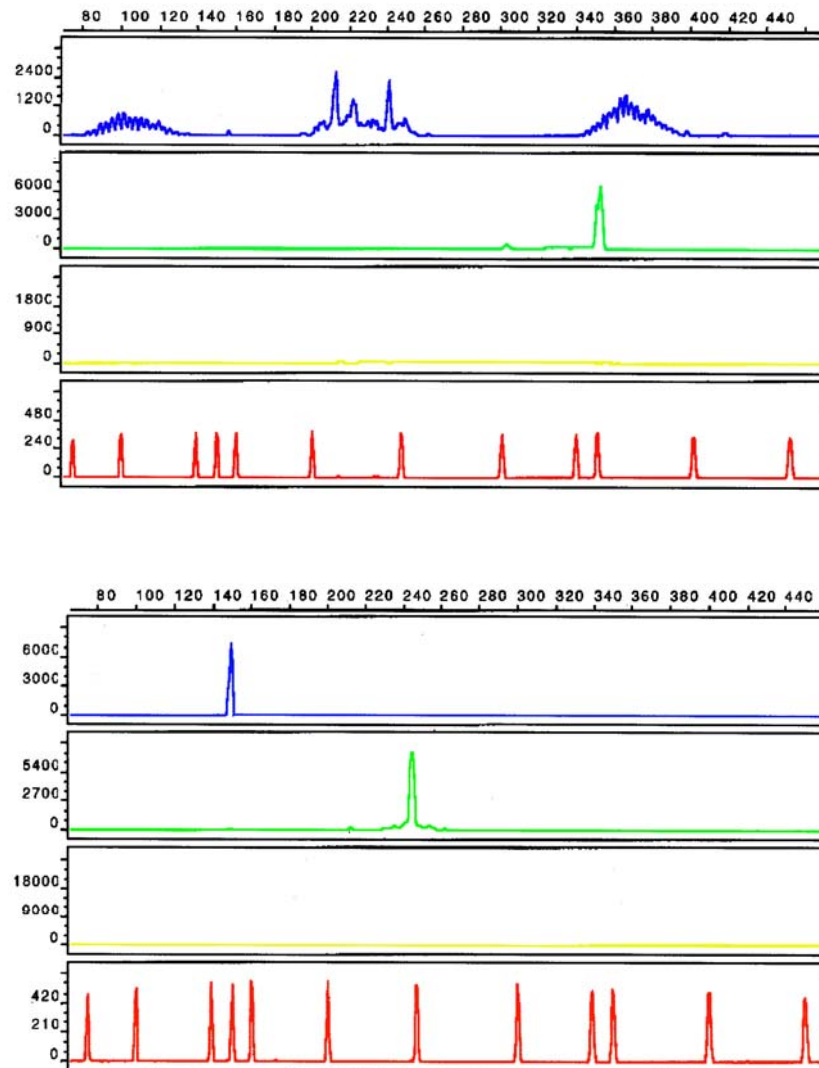


Abb. 5: Beispiele von GeneScan-Analysen.

Oben: GenScan Analyse eines T-Zell-Lymphoms mit klonalem TCRg-Rearrangement in beiden Allelen. Die Diagnose wird durch relativ hohe Hintergrundsignale anderer T-Zellklone erschwert.

Unten: TCR γ -spezifische Multiplex-PCR des selben Falles zur Sicherung der Diagnose. Der Peak im blauen Kanal unterscheidet sich um ca -90 bp vom rechten Peak im oberen Diagramm und ist somit von einem V3P Gen. Der Peak im grünen Kanal ist um 34bp grösser als der linke Peak im oberen Diagramm und entspricht somit einem Rearrangement mit einem V1-Gen.