

2 EINLEITUNG

2.1 Allgemeines

Maligne Lymphome bzw. lymphatische Leukämien entstehen aus Zellen des lymphatischen Systems bzw. deren Vorstufen. Diese werden nach histologischen Kriterien in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Abhängig von der Herkunft der malignen Zellen unterscheidet man B-NHL und T-NHL. Im Gegensatz zu B-NHL, die ihren Ursprung von B-Lymphozyten, benannt nach der Bursa fabricii (ihrem Reifungsort bei Vögeln), nehmen, stammen die T-NHL von T-Lymphozyten ab, deren Reifungsort der Thymus ist. An T-NHL, die Hauptgegenstand der vorliegenden Untersuchung sind, erkranken in Europa und in den USA jährlich ca. 1-2 von 100.000 Einwohnern und machen ca. 2 % aller bösartigen Tumorerkrankungen aus, während sie im Orient und in Asien deutlich häufiger vorkommen^{1,2,3}.

Die Diagnostik maligner Lymphoproliferationen erweist sich nach wie vor als schwierig und wirft nicht selten Probleme hinsichtlich der Abgrenzung zwischen reaktiven und neoplastischen Prozessen auf. Versteht man maligne Neoplasien als klonale, aus einer maligne transformierten Zelle hervorgegangene Proliferation, so sind Klonalität und Linienzugehörigkeit bei der Diagnosefindung von wesentlicher Bedeutung. In den vergangenen Jahren wurde die Diagnostik maligner Lymphome durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, die gegen B- oder T-Zelloberflächenantigene gerichtet sind, wesentlich verbessert. Sie unterstützen die Diagnostik insofern, als sie bei der Frage der Linienzugehörigkeit und der Subtypisierung eines Lymphoms entscheidend sind. Im Initialstadium einer malignen lymphatischen Proliferation ist jedoch mittels immunhistologischer Methoden eine Aussage bezüglich der Klonalität und damit in der Regel der Malignität nur eingeschränkt möglich.

Für den Verlauf und die Prognose eines Lymphoms ist aber eine frühzeitige Diagnosestellung bzw. Rezidiverkennung von großer Bedeutung. Hier kann eine hochsensitive molekularbiologische Methode zum Nachweis der Antigenrezeptorgenumlagerungen für das klinische Management von Lymphom- und Leukämiepatienten eine praktische Bedeutung erlangen. Maligne Lymphoproliferationen haben identische Antigenrezeptorkonfigurationen

der Tumorzellen, d.h. sie sind monoklonal. Durch deren Nachweis auf molekularbiologischer Ebene ist es möglich, zwischen einer benignen und malignen Lymphoproliferation zu unterscheiden und damit eine Diagnose zu stellen. Diese Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit dem Klonalitätsnachweis von T-Zell-Proliferationen, da hier im Gegensatz zu den B-Zell-Lymphomen das Repertoire immunhistologischer Marker eingeschränkt ist und zum anderen die Diagnostik extranodaler T-Zell-Lymphome wie z. B. der Haut nur schwer von entzündlichen Veränderungen abzugrenzen sind.

2.2 Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Die histologische Diagnostik von lymphoproliferativen Erkrankungen basiert auf der kombinierten Analyse von Morphologie, Verteilung und Immunphänotyp der malignitätsverdächtigen Zellen. Das diagnostische Repertoire wurde in den letzten 15 Jahren durch die Verfügbarkeit mono- und polyklonaler Antikörper dramatisch erweitert, mit denen Zellart-spezifische Antigene immunhistologisch sichtbar gemacht werden können. Dennoch stellt die histologische Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome nach wie vor ein großes Problem für Pathologen und auch Kliniker dar, was sich in der Vielzahl der Klassifikationsvorschläge widerspiegelt. Allein in den letzten zwei Jahrzehnten wurden über 7 verschiedene Klassifikationsvorschläge erarbeitet, von denen im Wesentlichen nur die in Nordamerika eingeführte *Working Formulation* und in Deutschland und einigen Ländern Europas die *Kiel-Klassifikation* Bestand hatte. Die *Working Formulation*⁴ berücksichtigt die konventionelle Histologie und Überlebensraten, gemessen an den als historisch anzusehenden Behandlungsprotokollen der 70er Jahre. Die in Europa bisher gängige *Kiel-Klassifikation*⁵ definiert Entitäten nach zytologischen und immunhistologischen Kriterien und teilt sie anhand der Krankheitsverläufe in niedrig- und hochmaligne Lymphome ein. Da die *Kiel-Klassifikation* und die *Working Formulation* auf völlig unterschiedlichen Konzepten aufbauen, die Lymphomentitäten verschieden definieren, eine unterschiedliche Terminologie anwenden sowie ein unterschiedliches Gradingssystem benutzen, sind die Ergebnisse klinischer und wissenschaftlicher Studien maligner Lymphome von diesseits und jenseits des Atlantiks nicht direkt vergleichbar. Um diese unbefriedigende Situation zu lösen, fanden sich Anfang der 90er Jahre führende Hämatopathologen (ILSG, International Lymphoma Study Group) aus den USA und Europa in Berlin zusammen, um eine neue, dem gegenwärtigen

Kenntnistand angepaßte Klassifikation der malignen Lymphome zu erarbeiten. Diese Klassifikation erhielt die Bezeichnung "Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms"⁶ (*R.E.A.L.-Klassifikation*). Sie grenzt *biologische* Krankheitsentitäten ab, in dem sie die konventionelle Morphologie, den Immunphänotyp, den Genotyp sowie klinische Parameter berücksichtigt. Sie umfaßt den Morbus Hodgkin und alle NHL. Hierbei werden NHL nach ihrem Ursprung im T- oder B-Zell-System und nach der Abstammung von Vorläuferzellen oder peripheren Funktionszellen eingeteilt. Erstmals werden auch extranodale Lymphome (wie z.B. das intestinale T-Zell-Lymphom) eingeschlossen (Tab. 1). Die Einteilung in zwei Malignitätsgrade (wie bei der *Kiel-Klassifikation*) entfällt, da man das Konzept verfolgt, daß unterschiedlich aggressive Varianten ein- und dieselbe Lymphomentität repräsentieren können. Neueste Studien haben gezeigt, daß sich die R.E.A.L.-Klassifikation, die nunmehr in den führenden amerikanischen und europäischen onkologischen Zentren routinemäßig angewendet wird, durch eine außerordentlich hohe Reproduzierbarkeit auszeichnet. Daher ist sie Grundlage der zur Zeit entstehenden *WHO-Klassifikation*^{7,8}.

Tab. 1: T-Zell-Neoplasien in der R.E.A.L.-Klassifikation

Vorläufer T-Zell-Neoplasien

Akute T-Lymphoblastische Leukämie (T-ALL)

Lymphoblastisches Lymphom vom T-Zell-Typ (T-LBL)

Periphere T-Zell-Neoplasien

Chronische lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ (T-CLL)

Mycosis fungoides (MF)/Sézary Syndrom (SS)

Periphere T-Zell-Lymphome, unspezifiziert

Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AILD)

Nasales (angiozentrisches) Lymphom

Intestinales T-Zell-Lymphom

Adultes T-Zell-Lymphom/Leukämie (ATL)

Anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL), T-Zell- und 0-Zell-Typ

2.3 Der T-Zellrezeptor: Aufbau und Funktion

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist eine Glykoproteinstruktur, die Antigen in Verbindung mit einem MHC-Molekül spezifisch binden kann. Der TCR besteht aus verschiedenen Untereinheiten, die ein Heterodimer bilden, das sich aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten, entweder α/β oder γ/δ , zusammensetzt. Das α/β - oder γ/δ -Heterodimer ist in der Zellmembran einer T-Zelle verankert und dort mit dem dicht benachbarten CD3-Komplex assoziiert, der für die Signalübermittlung an das Zellinnere unentbehrlich ist.

Im Gegensatz zu den Immunglobulinen der B-Zellen bleiben die TCR-Moleküle mit ihrem transmembranösen Anteil in der Lymphozytenmembran verankert und können nicht sezerniert werden. Unter physiologischen Bedingungen erkennt der α/β -TCR das Fremdanigen an der Oberfläche nur in Zusammenhang mit dem körpereigenen Histokompatibilitätsantigen (MHC)^{9,10}. Diese Besonderheit der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten ist als "MHC-Restriktion" bzw. als "Zinkernagel-Doherty-Phänomen"¹¹ bekannt. In dieser Hinsicht lassen sich zwei T-Zell-Subpopulationen unterscheiden¹²: 1.) Die CD4-positiven Lymphozyten, die auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet werden, erkennen ein Antigen nur dann, wenn MHC-Klasse II Moleküle auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimiert werden. Hierbei stabilisiert das CD4 Molekül den TCR/MHC-Klasse II/Fremdanigen-Komplex. 2.) Die als Suppressor oder zytotoxische T-Zellen bekannten T-Lymphozyten binden Antigene bevorzugt in Assoziation mit MHC-Klasse I Molekülen. Hierbei hat das CD8-Molekül die Funktion, die Bindung zum MHC-Klasse I Molekül zu stabilisieren, während der antigenspezifische Rezeptor sowohl Determinanten des Antigens als auch des MHC-Moleküls bindet.

Mehr als 95% der T-Lymphozyten beim gesunden Menschen tragen den α/β -TCR, während der γ/δ -TCR in weniger als 5% hergestellt wird. Letztere exprimieren gelegentlich CD8, meist jedoch weder CD4 noch CD8. γ/δ -T-Zellen agieren überwiegend als zytotoxische Zellen, die nicht notwendigerweise klassische MHC-Moleküle miterkennen. Sie treten beim Menschen gehäuft im Epithel der Haut und des Magen-Darm-Traktes auf. Die endgültige funktionelle Bedeutung dieser T-Zellsubpopulation ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Ähnlich den Immunglobulinmolekülen der B-Zelle finden wir auch bei den TCR einen großen extrazellulären Anteil, der aus einem Teil der konstanten ("constant region, C-) und einer

antigenbindenden variablen (V-) Domäne besteht. Im Gegensatz zu den Immunglobulinen sind T-Zellrezeptoren jedoch monovalent. Dies bedeutet, daß nur eine "Mulde" im Rezeptormolekül vorhanden ist und somit nur ein Antigenmolekül gebunden werden kann. Diese Bindungsstelle wird von zwei, kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpften Peptidketten geformt, einer 47 bis 52kDa großen α - und einer 40 bis 44 kDa großen β -Kette (Abb. 1).

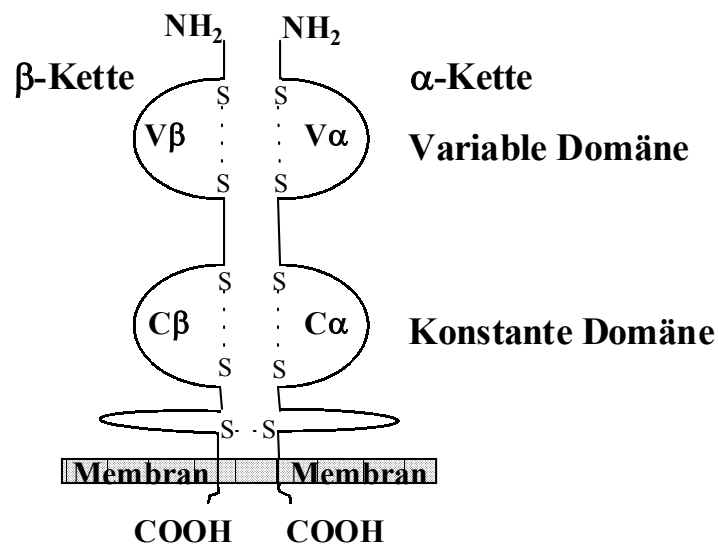


Abb. 1: Schematische Darstellung des TCR- β Proteins.

(S—S entsprechen Disulfidbrücken)

2.4 Konfiguration der T-Zellrezeptor-Gene in lymphatischen Zellen

Bei den Immunglobulinen der B-Zellen und den T-Zellrezeptoren der T-Zellen spielt die somatische Rekombination einzelner Genelemente, das Genrearrangement, für die Entstehung der immensen Vielfalt von Antigenrezeptoren, eine entscheidende Rolle. Hinsichtlich der Keimbahn-Organisation und des Mechanismus des Genrearrangements sind B- und T-Lymphozyten in weiten Teilen vergleichbar. Die variablen Domänen der Immunglobuline und T-Zellrezeptoren werden von verschiedenen Gensegmenten kodiert, die aufgrund von

Nukleotidsequenzhomologien den Familien der variablen (V-), Diversifikations (D-), Junktions (J-) und konstanten Elementen (C) zugeordnet werden.

Während die Gene, die für die β -Kette des T-Zellrezeptors kodieren, auf Chromosom 7q35 liegen¹³⁻¹⁷, befinden sich die kodierenden Gene für die α -Kette auf dem Chromosom 14q11 in der Nähe des Genkomplexes für die schwere Kette der Immunglobuline. Die γ -Kette liegt auf dem kurzem Arm von Chromosom 7p15. Der TCR- δ -Locus liegt innerhalb des TCR- α -Locus auf Chromosom 14¹⁸. Beim Rearrangement der Gene, die für die α -Kette des T-Zellrezeptors kodieren, gehen allerdings, bedingt durch ihre Lokalisation, die entsprechenden δ -Kettengene verloren.

Analog zu den Genen, die für die Immunglobuline kodieren, ist auch die zeitliche Abfolge des Rearrangements der T-Zellrezeptoren festgelegt. Im Thymus, in dem die Umlagerung dieser Gengruppe stattfindet, werden zuerst die für die γ - und δ -Ketten kodierenden Gene umgelagert. Anschließend werden sequentiell erst die Gene der β - und dann der α -Kette neukombiniert¹⁹. Dieser Prozeß verläuft parallel zu den intrathymischen Reifungsprozessen, die in der äußeren Rindenstruktur (Cortex) beginnen und im Markbereich des Thymus enden. Auch für den Austritt aus dem Thymus in das periphere Blut scheint die jeweilige Rezeptorstruktur einer T-Zelle entscheidend zu sein. T-Zellen, deren Rezeptor im Thymus zu stark an eigene Strukturen vom Typ der HLA-Klasse I und II Antigene binden, gehen noch im Thymus zugrunde. Dies bezeichnet man als "negative Selektion". Andererseits werden auch T-Zellen, die im Thymus weder HLA-Klasse I noch Klasse II Moleküle erkennen, ebenfalls in die Apoptose überführt ("Selbst-MHC-Restriktion oder positive Selektion"). Auf diese Weise werden im Thymus sowohl autoreaktive als auch funktionsuntüchtige T-Zellen ausgesondert. Bei diesem strengen Selektionsverfahren gehen mehr als 95% der im Thymus entstehenden T-Zellen in Apoptose, während ca. 2% der entstehenden T-Zellen überleben und in das periphere Blut abgegeben werden²⁰.

Die Generierung der Vielfalt von Antigenrezeptoren beruht vorwiegend auf zwei Prozeßen, zum einen auf der *rekombinatorischen Diversität* und zum anderen auf der *junktionalen Diversität*. 1. Die rekombinatorische Diversität umfaßt die möglichen Rekombinationen der variablen- (V), Diversifikation- (D) und Junktionssegmente (J) zu einem funktionellen VDJ-Genabschnitt. Dazu muß eines der V-Genelemente mit einem J-Genelement rekombiniert werden. Existieren D-Elemente, wie im Genlocus für die β - und δ -Kette des T-Zellrezeptors,

vollzieht sich die Genumlagerung in zwei Schritten. Zuerst wird ein D-Gensegment mit einem J-Segment rekombiniert, darauf folgt im zweiten Schritt die Anlagerung eines V-Genes an den bereits neukombinierten D-J-Komplex. Diese Rekombination wird durch spezifische Rekombinasen (RAG1 und RAG2)²¹ vermittelt, die bestimmte Signalsequenzen erkennen, welche die einzelnen Gensegmente an ihrem 5'-und 3'-Ende flankieren. Während es bisher noch nicht endgültig gelungen ist, diese Rekombinasen zu isolieren und zu charakterisieren, sind die Signalstrukturen für das Genrearrangement bereits vollständig bekannt; sie gliedern sich in eine heptamere und eine nonamere Basenfolge, die jeweils - unabhängig von ihrer Lokalisation – eine nahezu identische Sequenz aufweisen. In Abhängigkeit von ihrer 5'- oder 3'-Position zum variablen Genelement sind Heptamere und Nonamere entweder durch 12 oder 23 Basenpaare lange Einschübe voneinander getrennt, deren Sequenzen jedoch beliebig sind (Abb. 2). Das einfachste Modell für das Rearrangement postuliert, daß die zueinander homologen Heptamer/Nonamer-Sequenzen benachbarter Genelemente unter Herausschneiden aller dazwischenliegender Bereiche, Basenpaarungen eingehen. Es impliziert auch die Deletion aller δ -Kettengene bei der Umlagerung der Genregion für die α -Kette des TCRs. Ist diese sogenannte "stem- & loop-Konfiguration" erreicht, katalysieren die Rekombinasen die Verknüpfungen der variablen Gensegmente, wobei die zuvor entstandene "Loop-Region" ausgeschnitten wird²².

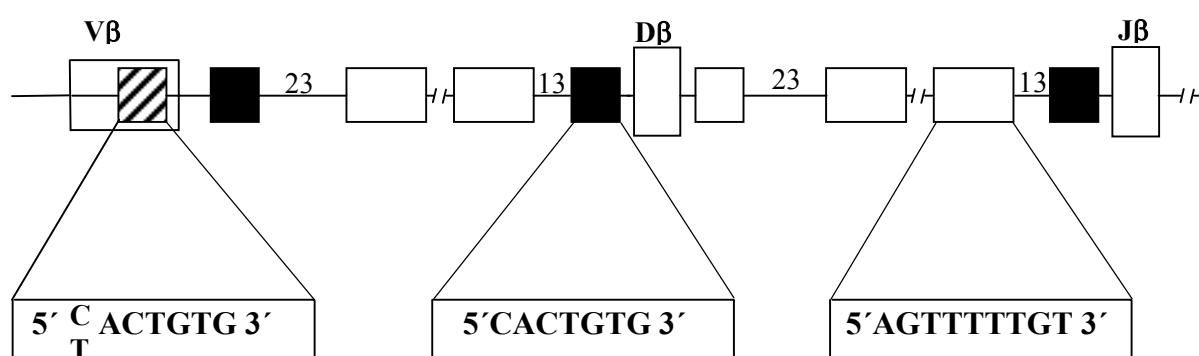


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der Heptamer/Nonamer Signalsequenzen relativ zu den Gensegmenten.

2. Durch die junktionale Diversität wird die Vielfalt der TCRs noch erheblich durch ein sogenanntes “imprecise joining” der an der Rekombination beteiligten Gensegmente gesteigert. Von entscheidender Bedeutung sind dabei die Möglichkeiten der Deletion von terminalen V-3'- und J-5'- Nukleotiden durch Nukleasen sowie die Insertion von nach dem Zufallsprinzip eingebauten Nukleotiden (N-Nukleotide) an den Verknüpfungsstellen der einzelnen Keimbahnsegmente durch das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT). N-Nukleotide können sowohl an der V-D als auch an der D-J Junction eingefügt sein (Abb. 3). Darüber hinaus können die D-Elemente gänzlich fehlen, nur teilweise oder mit verschiedenen D-Elementen fusioniert vorliegen. Die beschriebenen Prozesse stellen die Grundlage für die Generation von mehr als 10^6 verschiedenen funktionellen TCR dar. Die resultierende hypervariable Genkonfiguration (V-N-D-N'-J) stellt somit einen molekularbiologischen Fingerabdruck für jede individuelle T-Zelle und alle aus ihr entstehenden Tochterzellen dar.

Keimbahnsequenz

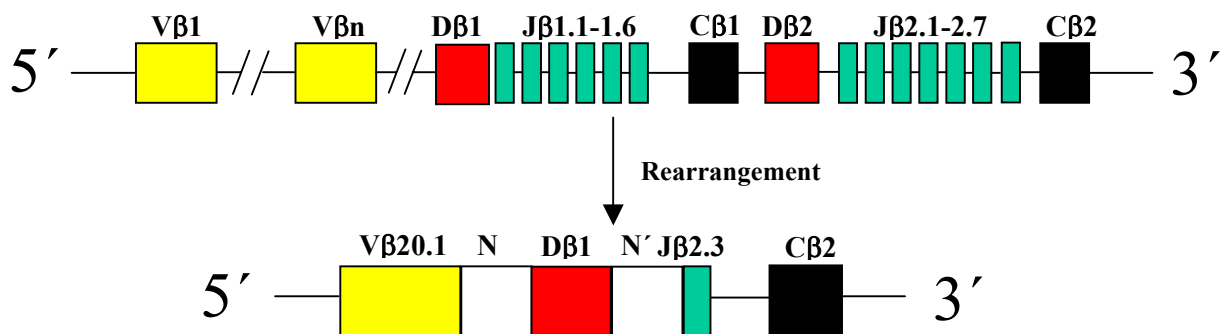


Abb. 3: Schematische Darstellung der Formation des TCR-β Gens während des Umlagerungsprozesses.

Maligne T-Zell-Neoplasien entstehen durch klonale Proliferation einer einzelnen maligne transformierten T-Zelle. Die neoplastischen T-Zellen enthalten eine identische Umlagerung des TCR-β Gens, d.h. bei allen Zellen einer Neoplasie sind die Sequenzen der V-N-D-N'-J-Region identisch. T-Zellen mit identischer Genumlagerung bezeichnet man als *monoklonal*. Im Gegensatz dazu findet man bei einem reaktiven Geschehen T-Zellen mit unterschiedlichen Genkonfigurationen (*polyklonal*). Aufgrund dieser Besonderheit eignet sich die

molekularbiologischen Analyse der hypervariablen **V-N-D-N'-J Region** als DNA-Tumormarker für T-Zellen.

Anfangs stellte die Southern-Blot-Hybridisierung²³ die einzige Methode für die Analyse von Antigenrezeptorumlagerungen dar. Besonders in der molekulargenetischen Diagnostik von Leukämien und Lymphomen wurden zunächst entsprechende Gensonden, die an die V- und C-Segmente binden, eingesetzt²⁴⁻²⁹. Diese Technik hat sich jedoch in der Routinediagnostik wegen der radioaktiven Belastung, der geringen Sensitivität (mind. 5 % monoklonale T-Zellen), des hohen Zeitaufwands (ca. 5 Tage) und der Erfordernis großer Mengen hochmolekularer DNA (ca. 10 µg pro Ansatz) nicht durchsetzen können.

2.5 Analyse der TCR-Genumlagerungen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Seit der Entwicklung der in vitro-DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction", PCR)^{30,31} hat diese rasch an Bedeutung für klinische Fragestellungen gewonnen. Mit der PCR lassen sich die Nachteile der oben beschriebenen Southern-Blot-Methode umgehen. Die PCR erlaubt die Amplifikation von DNA aus geringen Ausgangsmengen in sehr kurzer Zeit. Zahlreiche Versuche wurden bisher unternommen, um diese Technik als Ergänzung zu den morphologischen und immunologischen Methoden in der Lymphom- und Leukämiediagnostik zu nutzen. Das Prinzip dieser PCR beruht darauf, daß bei einer polyklonalen Proliferation die Umlagerung der TCR-Gene in den einzelnen T-Zellen voneinander differiert, während sie bei monoklonalen T-Zell-Proliferationen identisch ist. Bei einer polyklonalen Proliferation von T-Zellen stellen sich die V-N-D-N'-J-Amplifikate wegen der vielen unterschiedlichen Umlagerungen als verschiedene Produktgrößen dar, die sich in der Gelelektrophorese als unscharf begrenzter, breiter "Bandenschmier" zeigen. Im Gegensatz dazu findet man bei einer monoklonalen T-Zell-Proliferation, (d.h. von Zellen mit identischer V-N-D-N'-J-Umlagerung und damit identischer Produktgröße) eine scharf begrenzte, singuläre Bande in der Gelelektrophorese.

Die meisten Klonalitätsanalysen konzentrieren sich auf die Untersuchung der TCR-β und TCR-γ Gene. Das Gen für die TCR-α Kette ist für routinemäßige Untersuchungen zu komplex aufgebaut und die dazwischenliegenden TCR-δ Gene sind in reifen T-Zellen meist

deletiert³². Daher kommen die α und δ Kette des T-Zellrezeptors nicht für Klonalitätsanalysen in Frage.

Die Etablierung einer PCR zum Nachweis von TCR- β Umlagerungen scheiterte bisher weitgehend aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher V- und J-Gensegmente. Bisherige Ansätze erlaubten lediglich den Nachweis sehr großer klonaler T-Zellpopulationen vorzugsweise aus nicht denaturierten Zellen^{33,34}. Sie sind deshalb nicht in der Lage, eine kleine monoklonale T-Zellpopulation in einem polyklonalen Infiltrat zu identifizieren und somit eine Frühdiagnose zu stellen. Im Gegensatz zum TCR- β Gen zeigt das TCR- γ Gen einen relativ einfachen Aufbau (12 V- und 5 J-Segmente)^{35,36}, das die relativ einfache Durchführung einer PCR erlaubt. Mit dieser Methode kann ein Großteil der klonalen T-Zellpopulationen, auch in Formalin-fixierten Geweben, erfaßt werden³⁷. Allerdings entgehen mit den beschriebenen TCR- γ PCR-Assays unabhängig vom Tumorzellgehalt 10–50 % der klinisch und histologisch gesicherten T-Zell-Lymphome der Entdeckung³⁸⁻⁴⁶.

2.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue auf der PCR-basierende Methode zum Nachweis klonaler Genumlagerungen der TCR- β -Kette an genomischer DNA zu entwickeln. Für die Produktanalyse soll dabei eine automatisierte und hochauflösende Elektrophorese mit Nachweis Fluoreszenzfarbstoff-markierter TCR- β PCR-Produkte (GENESCAN-Analyse) etabliert werden.

Folgende Anforderungen werden an diese Methode gestellt.

1. In morphologisch und immunhistologisch unklaren Fällen muß sie zwischen reaktiven und malignen lymphoproliferativen Erkrankungen unterscheiden und damit als Ergänzung zur histologischen und klinischen Diagnostik mit ökonomisch vertretbarem Arbeits- und Materialaufwand regelmäßig eingesetzt werden können.
2. Die Detektionsrate von klonalen T-Zellpopulationen muß im Vergleich zu bisher verfügbaren TCR- β und TCR- γ PCR-Methoden höher sein.
3. Der Klonalitätsnachweis muß auch an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Material möglich sein.
4. Die PCR-Produktanalyse mittels der GENESCAN-Technik muß eine Abgrenzung monoklonaler Zellpopulation von einem polyklonalen Hintergrund ermöglichen.
5. Sie muß Amplifikate liefern, die direkt sequenzierbar sind.