

Bedeutung genetischer Aberrationen für die histopathologische und klinisch-prognostische Klassifikation maligner Lymphome

Svetlana Harder, Reiner Siebert, Werner Grote, Brigitte Schlegelberger,
Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität Kiel

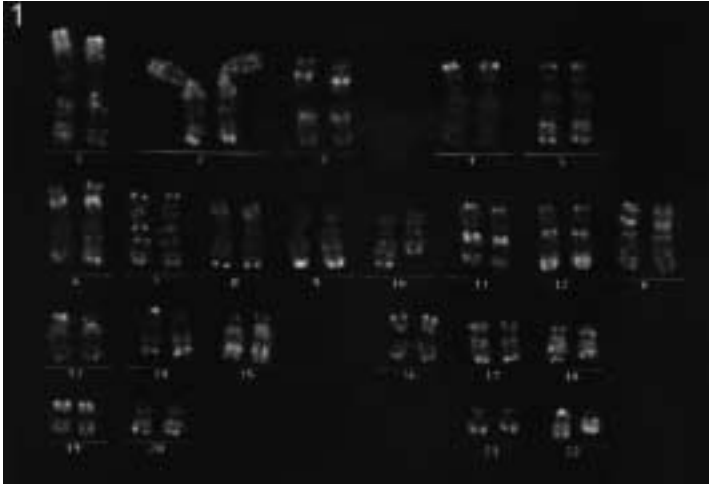


Abb 1 Karyotyp eines follikulären Lymphoms mit der typischen $t(14;18)(q32;q21)$ und einer $del(10)(q23q25)$ als sekundärer Aberration. Die aberranten Chromosomen sind rechts angeordnet. Fluoreszenz-R-Bandendarstellung.

Nachdem Lore Zech und Mitarbeiter im Jahr 1976 die erste charakteristische Chromosomentranslokation eines malignen Lymphoms, die $t(8;14)$ bei Burkitt-Lymphomen beschrieben hatten, wurde in den beiden folgenden Jahrzehnten eine Vielzahl charakteristischer Chromosomenanomalien bei Non-Hodgkin-Lymphomen identifiziert (Tab 1). Durch die Klonierung der Bruchpunkte und die Isolierung der betroffenen Gene konnten inzwischen bei verschiedenen dieser Chromosomenaberrationen, wie z.B. den Translokationen $t(8;14)$, $t(14;18)$, $t(11;14)$ oder $t(2;5)$, nicht nur die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen geklärt werden, sondern auch molekulargenetische und molekularzytogenetische Nachweismethoden etabliert werden. Der Vergleich genetischer, histopathologischer und klinischer Daten schließlich zeigte, daß eine Reihe typischer Chromosomenveränderungen mit definierten klinisch-pathologischen Lymphomentitäten assoziiert sind (Fonatsch 1993). Diese primären Chromosomenanomalien treten bereits sehr früh in der Lymphomentwicklung auf und werden sekundären Veränderungen gegenübergestellt, die aufgrund einer klonalen Evolution während der Tumorprogression entstehen. Der Nachweis typischer sekundärer Chromosomenaberrationen erlaubt häufig konkrete Aussagen zum klinischen Verlauf (Tab 2).

In B-Zell-Lymphomen sind bevorzugt die Immunglobulingene – das in der Bande 14q32 lokalisierte Gen für die schwere Kette des Immunglobulins (IgH), das in der Bande 2p13 lokalisierte Gen für die leichte Kette κ und das

in der Bande 22q11 lokalisierte Gen für die leichte Kette λ –, in T-Zell-Lymphomen die in den Banden 14q11, 7q35 und 7p15 lokalisierten T-Zell-Rezeptor-Gene an unterschiedlichen Translokationen beteiligt. Durch die Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte wurden eine Reihe von Onkogenen entdeckt, die als Translokationspartner unter die transkriptionelle Kontrolle der Immunglobulin- oder T-Zell-Rezeptor-Gene geraten und dadurch überexprimiert werden. Auch in jüngster Zeit wurden durch diese Strategie „neue“ Onkogene wie z. B. das Fibroblasten-Wachstums-Faktorrezeptor 3 (FGFR3)-Gen oder das BCL-9-Gen identifiziert (Chesi et al. 1997, Willis et al. 1998).

Nach wie vor sind die klassische Chromosomenanalyse und in jüngster Zeit zunehmend die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung die Methoden der Wahl zum Nachweis charakteristischer Chromosomenaberrationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen. Während bei der Chromosomenanalyse ein Überblick über sämtliche chromosomalen Veränderungen des Tumorzellklons gewonnen wird, können mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nur die genetischen Veränderungen erkannt werden, nach denen gezielt gesucht wird. Da jedoch mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auch Interphasezellen untersucht werden können, ist diese Methode auch an nicht oder wenig proliferierendem Gewebe, das einer Chromosomenanalyse schwer bzw. gar nicht zugänglich ist, z. B. an Blut oder Knochenmarkausstrichen, anwendbar (Siebert und Weber-Matthiesen 1997). Im folgenden sollen die häufigsten kli-

nisch relevanten Chromosomenaberrationen der Non-Hodgkin-Lymphome dargestellt werden.

Die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ ist die häufigste Chromosomenaberration der B-Zell-Lymphome. Abb. 1 zeigt den Karyotyp eines $t(14;18)$ positiven Keimzentrumslymphom. Die $t(14;18)$ wird mit Hilfe der Chromosomenanalyse bei 80-85% aller follikulären Lymphome, bei etwa 30% der diffus-großzelligen (cb-) Lymphome und vereinzelt bei Burkitt-Lymphomen beobachtet. Follikuläre Lymphome mit einer $t(14;18)$ zeigen einen eher indolenten Verlauf mit einer 5 Jahres-Prognose von 6-7 Jahren. Diffus-großzellige Lymphome mit einer $t(14;18)$ gelten als hochmaligne Variante der Keimzentrumslymphome und können im Rahmen der Tumorprogression aus follikulären NHL hervorgehen. Während einer solchen Transformation treten dann zumeist eine Reihe sekundärer Chromosomenveränderungen hinzu. Als Beispiel ist in den Abb. 1-3 der Nachweis einer Deletion in 10q mittels Chromosomenanalyse und FISH gezeigt. Durch die $t(14;18)$ gelangt das intakte *bcl-2*-Gen in 18q21 aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus unter den regulativen Einfluß des *IgH*-Gens. Dies führt zur Überexpression eines strukturell intakten *Bcl-2*-Gens und zur Verhinderung des physiologischen Zelltods, der Apoptose. Dieser Vorgang immortalisiert zwar die Zelle, erst das Hinzutreten weiterer genetischer Aberrationen aber führt zur malignen Transformation. Dies erklärt, warum die Translokation $t(14;18)$ sowohl bei benignen lymphoproliferativen Erkrankungen wie auch im Blut gesunder Probanden auftreten

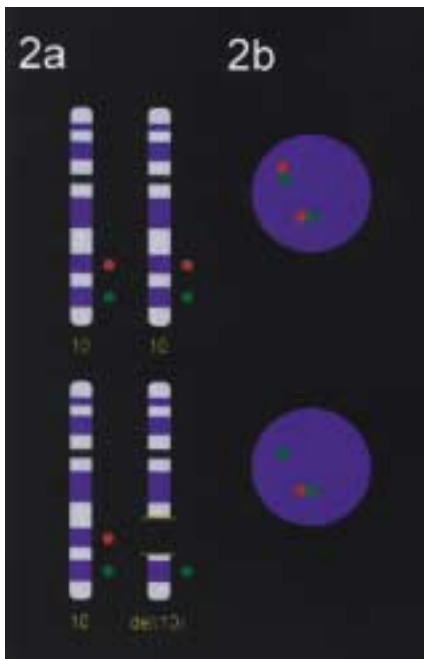


Abb 2 Schematische Darstellung des Nachweises einer del(10)(q24) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Es werden unterschiedlich markierte YAC-DNA-Sonden für die Region 10q23 (rot) und für die Region 10q25 (grün) eingesetzt.

Abb 2a In normalen Metaphasen tragen beide Chromosomen 10 jeweils ein rotes und ein grünes Signal. In Metaphasen mit einer interstitiellen Deletion trägt das aberrante Chromosom 10 nur ein grünes Signal.

Abb 2b In normalen Interphasezellen finden sich zwei rot-grüne Doppelsignale, in Interphasezellen mit einer Deletion 10q ein rot-grünes Doppelsignal, das dem normalen Chromosom 10 entspricht, und ein grünes Signal, das vom aberranten Chromosom 10 stammt.

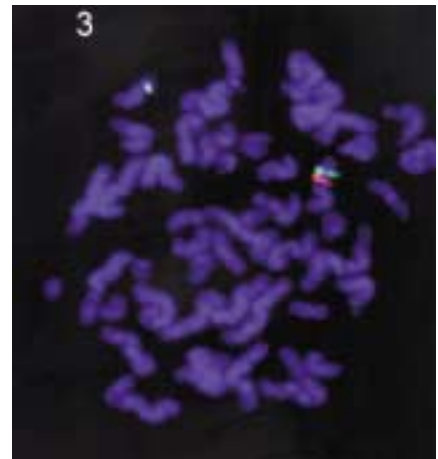


Abb 3 Metaphase der Karpas-Zelllinie, die eine hemizygoten Deletion 10q enthält. Das normale Chromosom 10 enthält ein rotes und ein grünes Signal, das Chromosom 10 mit der Deletion lediglich ein grünes Signal.

kann.

Die typische Burkitt-Translokation t(8;14)(q24;q32) oder ihre Varianten t(2;8)(p11;q24) und t(8;22)(q24;q11) sind zytogenetisch bei der Mehrzahl der Burkitt-Lymphome sowie bei den entsprechenden leukämischen Verlaufsformen, der akuten lymphatischen Leukämie vom B-Typ, selten auch bei anderen hochmalignen B-Zell-Lymphomen zu finden. Zwar zeigen die durch diese Translokationen charakterisierten Lymphome ein aggressives biologisches Verhalten, durch den Einsatz moderner Therapieregime kann jedoch ein großer Teil der Patienten geheilt werden. Molekulargenetisch gelangt bei den Burkitt-Translokationen das in der Chromosomenregion 8q24 lokalisierte c-myc-Onkogen unter den Einfluß des IgH-Gens in 14q32 oder eines IgL-Gens in 2p11 bzw. 22q11. Dies führt zur Überexpression des Transkriptionsfaktors c-myc und so in der Folge zur malignen Transformation. Da sich die Bruchpunktregion in 8q24 über einen Bereich von mehreren hundert kb erstreckt, ist ein molekulargenetischer Nachweis mittels PCR schwierig. Hier erweist sich der Nachweis der typischen Burkitt-Translokation t(8;14) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als vorteilhaft (Siebert et al. 1998).

Die Translokation t(11;14)(q13;q32) ist pathognomonisch für das Mantelzell-Lymphom, welches unter den niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen die schlechteste Prognose aufweist. Mit Hilfe der Chromosomenanalyse ist sie zytogenetisch in 50-90% der Mantelzell-Lymphome nachweisbar. Eine

Translokation t(11;14) wird aber auch bei den hochmalignen Varianten des Mantelzell-Lymphoms beobachtet und ist dort mit einer infausten Prognose verbunden. Auf molekularer Ebene resultiert diese Translokation in einer Anlagerung des für Cyclin D1 codierenden CCND1- (früher: bcl-1-) Gens in 11q13 an den IgH-Locus in 14q32, was zur Überexpression des Zyklins und somit zur Beschleunigung des Zellzyklus führt. Die Bruchpunkte im Bereich des bcl-1-Locus verteilen sich über eine noch größere genomische Region als bei der Burkitt-Translokation. Dies bedingt, daß mit molekulargenetischen Methoden, wie Southern-Blot-Hybridisierung und PCR, nur maximal 55-60% der Translokationen t(11;14) nachgewiesen werden können. Im Gegensatz dazu konnten wir für den von uns etablierten FISH-Assay zeigen, daß der molekulargenetische Nachweis durch die Varianz der Bruchpunkte nicht beeinträchtigt wird (Siebert et al. 1998a).

Weitere charakteristische Translokationen bei B-Zell-NHL sind die t(14;19)(q32;q13) bei der B-CLL und die t(3;14)(q27;q32) bei diffus großzelligen Lymphomen. Sie bewirken eine Verlagerung von Sequenzen der Onkogene bcl-3 von Chromosom 19q13 bzw. bcl-6 (laz-3) von Chromosom 3q27 an den IgH-Locus. Bei hochmalignen diffus-wachsenden B-Zell-Lymphomen mit einem großzelligen Anteil soll das Rearrangement des bcl-6-Gens eine Gruppe von Patienten mit häufig extranodalem Befall und guter Prognose charakterisieren (Offit et al., 1994).

Die Translokation t(2;5)(p23;q35) ist charakteristisch für CD30-positive großzellig-anaplastische Lymphome, die sich durch einen T-Zell-Phänotyp, häufige kutane Beteiligung, junges Alter der Patienten und eine vergleichbar gute Prognose auszeichnen. Die t(2;5) führt zur Fusion des npm-Gens in 5q35 mit dem alk-Gen in 2p23. Das resultierende npm/alk-Hybridprotein besitzt Tyrosinkinase-Aktivität. Der Nachweis der Translokation ist zytogenetisch, molekulargenetisch und mittels RT-PCR möglich. Weitere charakteristische Chromosomenaberrationen in T-Zell-Lymphomen sind die inv(14), die t(14;14) und die t(X;14) bei der T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL) und bei kutanen T-Zell-Lymphomen sowie die Trisomie 3 und Trisomie 5 bei peripheren T-Zell-Lymphomen (Schlegelberger et al. 1994). Von Stilgenbauer und Mitarbeitern (1997) wurde vor kurzem gezeigt, daß bei der T-PLL das ATM-Gen durch Deletion auf einem Allel und durch Punktmutationen auf dem anderen Allel inaktiviert wird. Auch bei B-Zell-Lymphomen, insbesondere bei der B-CLL, finden sich gehäuft Deletionen in 11q. ob hier auch das ATM-Gen betroffen ist, ist zur Zeit nicht geklärt. Ein weiteres Tumorsuppressor-Gen, das bei B- und T-Zell-Lymphomen von Bedeutung sein dürfte, wird in der Bande 13q14 in der Nähe des RB-Gens vermutet.

Im Gegensatz zu primären Chromosomenaberrationen treten sekundäre Veränderungen während der Tumorprogression auf. Sie sind in der Regel nicht spezifisch für bestimmte Subty-

Tab 1 Charakteristische Chromosomenaberrationen bei malignen Lymphomen

Chromosomen-aberration	Involvierte Gene	Histologischer Typ
B-Zell-Lymphome		
t(14;18)(q32;q21)	IgH	bcl-2
t(11;14)(q13;q32)	CCND1(bcl-1)	IgH
t(14;19)(q32;q13)	IgH	bcl-3
t(3;14)(q27;q32)	bcl-6	IgH
t(3;22)(q27;q11)	bcl-6	Igλ
t(2;3)(p12;q27)	Igκ	bcl-6
t(8;14)(q24;q32)	c-myc	IgH
t(8;22)(q24;q11)	c-myc	Igλ
t(2;8)(p12;q24)	Igκ	c-myc
T-Zell-Lymphome		
inv(14)(q11;q32.1)	TCR-α	TCL-1
t(14;14)(q11;q32.1)		
t(X;14)(q28;q11)	MTCP1	TCR-α
del(11q23)	ATM	
t(2;5)(p23;q35)	alk	npm

Tab 2 Sekundäre Chromosomenanomalien und damit assoziierte klinische Charakteristika bei malignen Lymphomen (modifiziert nach Offit, 1992)

Chromosomen-aberration	Klinische Bedeutung
+7; +12	histologische Transformation eines niedrig- in ein hochmalignes Lymphom und verkürzte Überlebenszeit
1p; 1q21-23; 6q; 17p	histologische Transformation eines niedrig- in ein hochmalignes Lymphom und verkürzte Überlebenszeit
1p32-36, 6q22-24; -11	Knochenmarkinfiltration
6q11-16	B-Symptomatik
3q21-25; 13q32	„bulky disease“
14q22-24	Milzbeteiligung
2p; 3p; 14	kutane Beteiligung
del(6)(q23); +11	Meningeninvolvierung
11q	gastrointestinale Infiltration

pen maligner Lymphome. Obwohl deshalb lange Zeit nur unzureichend beachtet, sind sekundäre Chromosomenveränderungen von besonderer klinisch-prognostischer Bedeutung (Tab. 2). Während die primären Alterationen zumeist Translokationen sind, spielen numerische Chromosomenaberrationen sowie Deletionen eine besondere Rolle als sekundäre Aberrationen. So gilt die Assoziation zwischen einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und der histologischen Transformation eines niedrigmalignen in ein hochmalignes Lymphom als gesichert (Döhner et al. 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, daß Deletionen des p53-Gens mit einem signifikant schlechteren Ansprechen auf eine Therapie mit Purin-Analoga und einer verkürzten Überlebenszeit korrelieren. Deletionen im langen Arm von Chromosom 6 (6q), welche zu den häufigsten sekundären Aberrationen bei malignen Lymphomen überhaupt gehören, sind sowohl bei niedrig-malignen als auch bei hochmalignen Lymphomen mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert. Ein verantwortliches Gen konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz zu Non-Hodgkin Lymphomen ist über die pathogenetischen Grundlagen des Morbus Hodgkin bisher wenig bekannt. Zytogenetische Untersuchungen beschrieben bei mehr als 100 Fällen von Hodgkin-Lymphomen aberrante Klone, konnten aber keine spezifischen Chromosomenveränderungen identifizieren (Schlegelberger et al., 1994a). Dabei liegt das methodische Problem bei der zytogenetischen

und molekularen Analyse dieses Tumors insbesondere darin, daß die neoplastischen Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen im Vergleich zu den sie begleitenden reaktiven Zellen nur einen Anteil von wenigen Prozent ausmachen. Erst durch die Kombination von Immunfluoreszenz und FISH in Form der FICTION-Technik und parallel durchgeführte zytogenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen klonalen Ursprungs sind und einen komplex aberranten, tri- bis tetraploiden Chromosomensatz besitzen (Weber-Matthiesen et al. 1995).

Ausblick

Spätestens seit Einführung der „Revised American European Lymphoma“ (REAL)-Klassifikation sowie der neuen WHO-Klassifikation ist der Nachweis genetischer Veränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen integraler Bestandteil bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung der einzelnen Entitäten und Voraussetzung für eine optimale Behandlung der Patienten unter Anwendung moderner Risiko-adaptierter Therapieregime. Bei manchen Lymphomen mit sehr ähnlicher Morphologie wie z. B. den chronischen lymphatischen Leukämien vom B-Typ (B-CLL) und den Mantelzell-Lymphomen bietet häufig nur die zytogenetische Analyse mit dem Nachweis einer typischen Veränderung wie der t(11;14) die Chance, diese Lymphome zu unterscheiden. Da die B-CLL über viele Jahre indolent verlaufen kann, während Patienten mit einem Mantelzell-Lymphom bei herkömmlicher Therapie eine mittlere Überlebenszeit von 2-3 Jahren haben

und nach neueren Erkenntnissen von einer Hochdosis-therapie und anschließender Stammzelltransplantation profitieren, ist die richtige diagnostische Einordnung für die Patienten von entscheidender Bedeutung. Es ist eine zukunftsweisende und lohnende Aufgabe für die Humangenetik, das Repertoire für die tumozytogenetische Diagnostik maligner Lymphome zu entwickeln und im Interesse der Patienten bereitzuhalten.

Literaturverzeichnis

Fonatsch C., Internist 1993;34:114-118
 Chesi M et al., Nature Genet 1997;16:260-264
 Döhner H et al., Leukemia 1997;11 Suppl 2:S19-24
 Offit K et al., N Engl J Med 1994;331:74-80
 Offit K, Leuk Lymph 1992;7:275-282
 Schlegelberger B et al., Blood 1994;83:505-511
 Schlegelberger B et al., Leukemia 1994a;8:72-80
 Siebert R et al., Blood 1998;91:984-990
 Siebert R et al., Ann Oncol 1998a; in press
 Stilgenbauer S et al., Nat Med 1997;3:1155-1159
 Weber-Matthiesen K et al., Blood 1995;86:1464-68
 Willis TG et al., Blood 1998;91:1873-1881
 Zech L et al., Int J Cancer 1976;17:47-56

Gefördert durch die Deutsche Krebshilfe, Projekt 10-0992-Schl 3 und die Wilhelm-Sander-Stiftung, Projekt 95. 003.1

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Brigitte Schlegelberger
 Institut für Humangenetik
 Christian-Albrechts-Universität Kiel
 Schwanenweg 24, 24105 Kiel
 Tel 0431-597-1780
 Fax 0431-597-1880
 schlegelberger@medgen.uni-kiel.de
 rsiebert@medgen.uni-kiel.de