

Labor(über)bestimmung

Klonale hämatologische Neoplasien

Klonale Zellen stammen von einer einzigen somatischen Zelle ab und weisen identische Eigenschaften auf. Innerhalb einer Neoplasie kann Klonalität heterogen sein und sich als dynamischer Prozess erweisen (1, 2). In den folgenden Abschnitten werden wir auf die Entwicklungen in der Diagnostik von klonalen hämatologischen Neoplasien eingehen, sowie Pitfalls und Einsatzmöglichkeiten im Alltag bei zunehmender Assay Verfügbarkeit thematisieren.

Les cellules clonales proviennent d'une seule cellule somatique et ont des propriétés identiques. Dans une néoplasie, la clonalité peut être hétérogène et s'avérer être un processus dynamique (1, 2). Dans l'article suivant, nous discuterons l'évolution du diagnostic des néoplasies hématologiques clonales, ainsi que des pièges et des applications possibles dans la vie quotidienne sous l'aspect d'une disponibilité croissante des tests.

Klonalität als Malignitätskriterium

Klonalität beschreibt die Abstammung einer Zellpopulation von einer gemeinsamen Ursprungszelle. Somit haben alle Zellen der Population ein gemeinsames Erbgut inklusiv erworbenen (somatischen) Mutationen. Diese Beschreibung trifft auf alle Zellen einer Neoplasie zu, da alle die initiiierende Mutation aufweisen, welche zu maligner Transformation der Ursprungszelle führte. Somit ist die (Mono-) Klonalität eine charakteristische Eigenschaft von allen Neoplasien und stellt ein wichtiges Diagnosekriterium dar (3). In den allermeisten Fällen ist allerdings eine einzige genetische Veränderung nicht für die maligne Entartung ausreichend, diese erfolgt durch eine schrittweise Akkumulation von Mutationen (Abb. 1). Dementsprechend ist die Grenze zwischen einer bereits klonalen, prämaligen Vorläuferpopulation und einer bösartigen hämatologischen Neoplasie oft fließend und durch integrative Berücksichtigung von Klinik, Morphologie und Genetik definiert (4).

Im Organismus stellen B- und T-Lymphozyten eine Besonderheit dar: zur Generierung der Diversität der B- und T-Zellrezeptoren erfolgt eine Rekombination von genomischen Sequenzen der Vorläuferzellen (Abb. 2). So werden physiologischerweise unzählige Klone gebildet, welche untereinander aber verschieden sind und so die Population als Ganzes als polyklonal betrachtet wird. B- und T-Zell Neoplasien entstehen meistens in Zellen, welche schon reife B- oder T-Zellrezeptoren gebildet haben, so kann der Nachweis eines dominanten Immunrezeptors zur Klonalitätsbestimmung herangezogen werden (5).

Labormethoden zum Klonalitätsnachweis

B-Lymphozyten weisen auf ihrer Oberfläche B-Zellrezeptoren mit Leichtketten Kappa oder Lambda auf, diese werden mit einer schweren Kette gepaart als Antikörper sezerniert. Die Auswahl des



**Dr. med. Dr. phil.
Matyas Ecsedi**
Basel

**PDDr. med.
Alix O'Meara Stern**
Basel

Leichtkettentyps erfolgt während der Entwicklung stochastisch und ist genetisch festgeschrieben. Physiologischerweise besteht eine B-Zellpopulation sowohl aus Kappa- und Lambda-restringierten Zellen, in einem Verhältnis um 2:1. Aus diesem Grund ist der Nachweis einer B-Zellpopulation mit einer Expression von ausschliesslich Kappa oder Lambda Leichtketten mit Hilfe der Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie ein Surrogat der Klonalität (6). Ähnliche Hinweise bezüglich der Klonalität von T-Zellen kann ein stark verschobenes Verhältnis von CD4 vs. CD8 T-Zellen oder von TCR α/β vs. TCR γ/δ liefern (7).

Mittels PCR können die Immunrezeptoren der B- und T-Lymphozyten direkt analysiert werden. Qualitativ kann die Länge der B- oder T-Zellrezeptoren einer Zellpopulation dargestellt werden und bei Vorliegen eines dominanten Immunrezeptors von einer umschriebenen Länge, im Gegensatz zur Normalverteilung bei Polyklonalität, der Klonalitätsnachweis erbracht werden. Zur quantitativen Bestimmung wird bei hoher Tumorlast bei Erstdiagnose zunächst die genetische Sequenz des klonalen Immunrezeptors bestimmt und anschliessend eine Patienten-spezifische quantitative PCR Probe entworfen. Diese kann im Verlauf zum hochsensitiven, qualitativen Nachweis des Neoplasie-spezifischen Immunrezeptors und somit z.B. von minimaler Resterkrankung (MRD) verwendet werden. Um eine hohe Qualität der Resultate dieser technisch anspruchsvollen Untersuchungen zu gewährleisten, wurden diese in den letzten Jahren standardisiert und ihre Interpretation vereinheitlicht (8).

Neben der Analyse der Immunrezeptoren können andere somatische Veränderungen in einer Zellpopulation durch (molekular-)genetische Methoden wie Zytogenetik, FISH, PCR oder next generation sequencing (NGS) zur Klonalitätsbestimmung herangezogen werden (Abb. 3). Oft kann dadurch, wie z.B. anhand der BRAF-V600E Mutation bei der Haarzelleukämie, neben dem Klonalitätsbeweis auch eine diagnostische Zuordnung erfolgen (9). Es ist absehbar, dass durch die Weiterentwicklung der NGS viele der obigen Methoden ersetzt werden können. Neben dem quantitati-

ven Nachweis von somatischen Punktmutationen, kann z.B. eine quantitative Analyse der Immunrezeptoren inkl. Status der somatischen Hypermutation des B-Zell Rezeptors, sowie der Nachweis von IgH-Translokationen in einem Test durchgeführt werden (8).

Klinische Relevanz des Klonalitätsnachweises

Die Abgrenzung zwischen benignem und malignem Prozess basiert in erster Linie auf klinischen und zyto-/histologischen Merkmalen der Erkrankung. Der klonale Beweis ist für viele Entitäten definiert. Die Charakterisierung des Klon und eine Quantifizierung spielen eine wichtige Rolle in der Kategorisierung (4). Als Beispiel kann hier die Unterscheidung der monoklonalen B-Zell Lymphozytose (MBL) low-count (B-Lymphozyten im peripheren Blut <0.5 G/l und chronische lymphatische Leukämie CLL-Phänotyp), die MBL high-count (B-Zell Population im peripheren Blut <5 G/l ohne weitere Zeichen der Lymphoproliferation) und die CLL (B-Lymphozytose im peripheren Blut >5 G/l) genannt werden. Die Unterscheidung dieser drei Entitäten ist für das Management wichtig. Während ein low-count MBL kaum in eine CLL fortschreitet und somit keine Verlaufskontrollen braucht, geht ein high-count MBL der CLL voraus und verlangt jährliche Kontrollen (10). Innerhalb der Entität CLL liefert das somatische Mutationsprofil der IGHV Gene neben anderen klinischen Faktoren und Biomarkern zusätzliche Informationen über das biologische Verhalten des einzelnen Tumors (11).

Bis zu 10% der lympho- und myeloproliferativen Prozesse stellen trotz integrativer Beurteilung der klinischen, zytologischen und histologischen Befunde diagnostische Herausforderungen dar (12). Der hinzukommende Klonalitätsnachweis bietet in solchen Fällen einen weiteren diagnostischen Weg und kann zur Klärung der Linienzugehörigkeit beitragen. Der klonale Marker trägt nicht nur zur Diagnosestellung und Kategorisierung bei, sondern nimmt in den Verlaufskontrollen einen zunehmenden Platz ein. Die MRD Dynamik ist zum essentiellen Bestandteil in der Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie geworden (13). Für die CLL oder Mantelzell-Lymphome sind MRD-Marker definiert und ihre Persistenz als Ausdruck einer schlechteren Prognose bewiesen (14, 15). Ihre Auswirkung auf den Therapieplan wird in einer Vielzahl von laufenden Studien untersucht, sodass deren umfassender Einsatz im klinischen Alltag aktuell noch verfrüht erscheint. Klinische Relevanz und Kostenwirksamkeit der Untersuchung sind wichtige Bewertungskriterien in Bezug auf den Einsatz der ver-

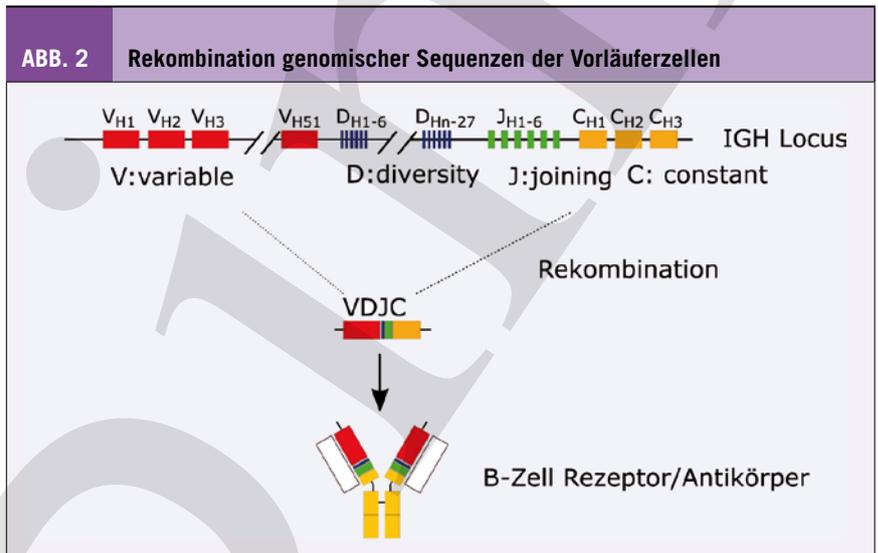
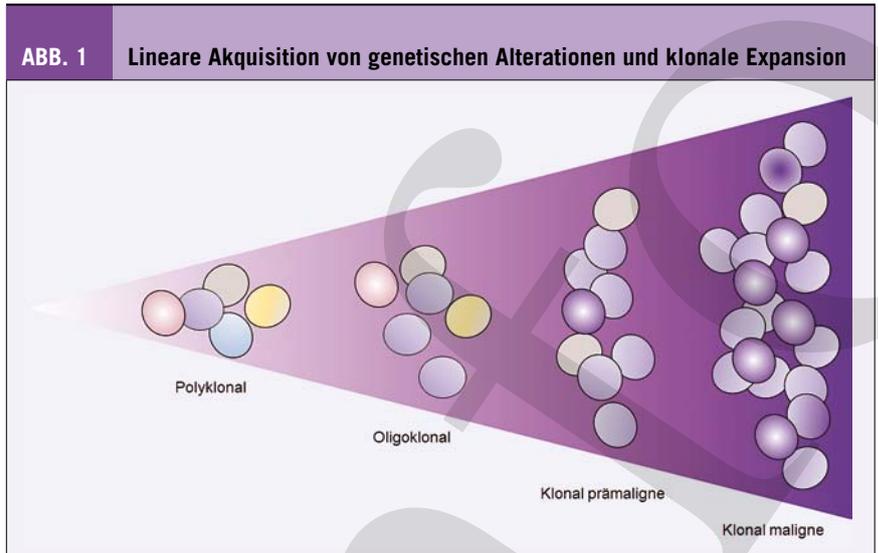


ABB. 3 Analyse somatischer Veränderungen zur Klonalitätsbestimmung

Mit der Immunphänotypisierung werden hauptsächlich zelluläre und Oberflächenmolekülen gemessen. Die Durchflusszytometrie gehört zur hämatologischen Routinediagnostik der Klonalität und hat auch einen Stellenwert in der Klassifizierung und in der MRD Kontrolle. Strukturelle oder numerische chromosomale Aberrationen können durch konventionelle Zytogenetik dargestellt werden. FISH (fluorescence in situ hybridization) wird zur gezielten Untersuchung von zytogenetischen Veränderungen in Ergänzung zur konventionellen Zytogenetik bei Erstdiagnose und im Verlauf durchgeführt.

Die Array-CGH (comparative genomic hybridization) ist eine sensitivere Methode um Deletionen oder Duplikationen zu erkennen und wird in ausgewählten Situationen in der Klonalitätsanalyse von hämatologischen Neoplasien angewandt.

DNA oder RNA-basierte molekulargenetische Methoden können bei entsprechender Fragestellung gezielt Mutationen nachweisen oder Rearrangements typisieren und damit zur korrekten Diagnose und MRD Kontrolle beitragen.

Mit der NGS (next generation sequencing) wird in der Tiefe nach genetische Variationen im breiteren Spektrum gesucht. Der Einsatz ist aktuell ausserhalb von Studien nur für ausgewählte Fälle reserviert.

Detektionstiefe von Klonalität

schiedenen Labormethoden zur Klonalitätsbestimmung. Die resultierenden Kosten (einfache Immunphänotypisierung ab 450 CHF bis 2800 CHF für ein NGS) erfordern ein sorgfältiges Ermessen, ob der Klonalitätsnachweis im klinischen Kontext erforderlich, rele-

vant und sachgemäss ist. Die Frage ob ein positiver oder negativer Befund für das Vorgehen von Bedeutung sei, ist präanalytisch konsequent zu beantworten. Hierzu dient ein enger Informationsaustausch zwischen Labor und Klinik, um unzweckmässige Analysen zu vermeiden. Mit der Asservierung von Material sind Nachbestellungen ausgehend von der Zytologie, Histologie und Immunphänotypisierung in Sinne einer Stufendiagnostik möglich.

Neben der Zweckmässigkeit und Kosteneffizienz, sind diagnostische Unsicherheiten und eine Vielzahl von technischen Fallen im Rahmen des Klonalitätsnachweises zu beachten. Zum einen bedeutet der Klonalitätsnachweis nicht obligat den Beweis einer Neoplasie. Klonalität von lymphatischen Zellen kann im Rahmen einer starken Antigen-Stimulation im Sinne einer benignen klonalen Proliferation auftreten. Falsch-positive Ergebnisse können durch Expansion von nicht-neoplastischen T-Zellen oder Veränderungen des immunologischen Repertoires beispielsweise im Alter oder nach einer Stammzell-Transplantation (skewing) entstehen (16, 17). Falsch-negative Ergebnisse entstehen beispielsweise durch Sampling-/ Amplifikationsprobleme oder durch klonale Evolution (8).

Die Auswirkung von Zufallsbefunden oder gar die Entdeckung vererbbarer Veranlagungen im Rahmen von genetischen Untersuchungen kann situativ unerwünscht sein. Zudem erfordert die

Interpretation der Datenmengen Expertise. Es braucht eine Konsensfindung zwischen Patient und behandelndem Arzt über die Möglichkeiten der Entdeckung von Zufallsbefunden mit oder ohne bisher etablierter Signifikanz und über den Umgang mit dieser Information.

Zusammenfassend findet eine spannende Entwicklung mit rascher Zunahme der technischen Möglichkeiten im Bereich der Diagnostik von klonalen hämatologischen Neoplasien statt. Mit Techniken wie der NGS werden sich die Möglichkeiten in der Präzisionsdiagnostik, Klassifikation und Therapie-Überwachung von hämatologischen Neoplasien vervielfältigen. Die Klonalitätsanalyse soll stets von der klinischen Fragestellung, Zytologie und Histologie nach sorgfältiger Erwägung der Zweckdienlichkeit ausgehen.

Dr. med. et phil. Matyas Ecsedi-Waibel, matyas.ecsedi@usb.ch

PD Dr. med. Alix O'Meara Stern, alix.stern@usb.ch

Universitätsspital Basel, Hämatologie

Petersgraben 4, 4031 Basel

+ **Interessenskonflikt:** Die Autoren haben deklariert, keine Interessenskonflikte in Zusammenhang mit diesem Beitrag zu haben.

+ **Literatur** am Online-Beitrag unter: www.medinfo-verlag.ch

Take-Home Message

- ◆ Klonalität ist eine gemeinsame Eigenschaft von allen hämatologischen Neoplasien.
- ◆ Die Grenze zwischen klonaler prämaligener Population und maligner hämatologischer Neoplasie ist nicht immer klar. Nicht nur der Klonalitätsbeweis, sondern deren Integration mit der Klinik, Morphologie und Genetik definiert eine Neoplasie.
- ◆ Klinische Relevanz und Kostenwirksamkeit der Untersuchung sind wichtige Kriterien bezüglich Einsatz der verschiedenen Labormethoden in einer gezielten Reihenfolge und setzen eine klare Kommunikation zwischen Klinik und Labor voraus.
- ◆ Entwicklungen in der Klonalitätsdiagnostik werden unsere diagnostischen und therapeutischen Algorithmen in den nächsten Jahren grundlegend verändern.

Message à retenir

- ◆ La clonalité est une caractéristique commune à toutes les néoplasies hématologiques.
- ◆ La transition entre la population clonale pré maligne et la néoplasie hématologique maligne n'est pas toujours claire. La néoplasie se définit non seulement par la preuve de clonalité, mais également par son intégration avec les données cliniques, la morphologie et la génétique.
- ◆ La pertinence clinique et la rentabilité de l'étude sont des critères importants pour l'utilisation des différentes méthodes de laboratoire dans un ordre ciblé et exigent une communication claire entre la clinique et le laboratoire.
- ◆ Les développements dans le domaine du diagnostic de clonalité changeront fondamentalement nos algorithmes diagnostiques et thérapeutiques dans les années à venir.

Literatur:

1. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 2017;168(4):613-28
2. Nadeu F et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127(17):2122-30
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74
4. Campo E et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, 2017
5. Jeon YK et al. Molecular Testing of Lymphoproliferative Disorders: Current Status and Perspectives. *J Pathol Transl Med* 2017;51(3):224-41
6. Landgren O et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2009;360(7):659-67
7. Mahe E et al. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol* 2018;71(3):195-200
8. Langerak AW et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012; 26(10):2159-71
9. Tiacci E et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood* 2012;119(1):192-5
10. Swerdlow SH et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375-90
11. Stevenson FK. Introduction to a review series on biological insights into lymphoid tumors. *Blood* 2018;131(21):2275
12. Gazzola A et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol* 2014;5(2):35-47
13. Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014(1):244-9
14. Thompson M et al. Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Novel Agents: A Review. *JAMA Oncol* 2018;4(3):394-400
15. Ferrero S, Dreyling M. European Mantle Cell Lymphoma N. Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: are we ready for a personalized treatment approach? *Haematologica* 2017;102(7):1133-6
16. Blackman MA, Woodland DL. The narrowing of the CD8 T cell repertoire in old age. *Curr Opin Immunol* 2011;23(4):537-42
17. Yew PY et al. Quantitative characterization of T-cell repertoire in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(9):1227-34