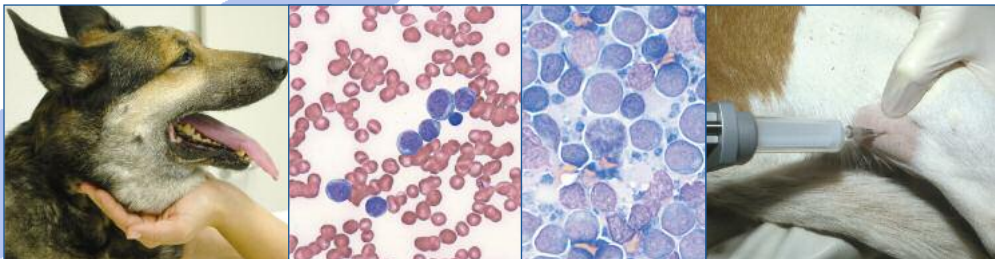




Abschlussbericht

Klon-DNA entlarvt Krebs

aus der gkf-Info 36 | Dezember 2012



Abschlussbericht

Klon-DNA entlarvt Krebs

Der bösartige Lymphdrüsenkrebs, das maligne Lymphom, gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen beim Hund. Die Diagnostik dieser Erkrankung kann sehr zeitaufwändig sein. Dadurch wird der Beginn der Therapie häufig verzögert. Unter der Leitung von Johannes Hirschberger wurde nun erfolgreich ein neues Verfahren erprobt, das die Diagnostik des malignen Lymphoms bei hoher Genauigkeit vereinfacht.

Maligne Lymphome sind bösartige Tumoren der Lymphozyten, hochspezialisierten Zel-

len des Immunsystems. Gerade im Anfangsstadium ist es oft schwierig mit den traditionellen Methoden der Zytologie (Zellkunde), ein malignes Lymphom von einer Reaktion des Immunsystems zu unterscheiden. In diesen Fällen kann man eine Labormethode (PARR) anwenden, die sich zunutze macht, dass ein malignes Lymphom durch die Entartung eines einzigen Lymphozyten entsteht.

Lymphozyten werden grob in T- und B-Lymphozyten unterteilt. Innerhalb der Fa-



Hochgradig vergrößerter Lymphknoten im Kieferwinkel eines Hundes, der an einem Lymphom erkrankt ist.

milien von T- und B-Lymphozyten gibt es wiederum verschiedene Zelltypen, die mannigfache Aufgaben bei der spezifischen Immunabwehr von Krankheitserregern haben. All diese Zellen gehören zwar zu einem Organismus, weisen aber geringe individuelle Unterschiede in ihrem Erbgut auf.

Abwehrreaktion oder Krebs?

Beim Kontakt mit einem Erreger werden unterschiedliche Lymphozyten aktiviert, damit sie als Team mit dem Eindringling rasch fertig werden. Dazu gehört auch, dass sich einige Lymphozyten vermehren, um dem Gegner mit möglichst großer Truppenstärke zu begegnen. Diese Zellvermehrung ist im Lymphknoten und im Blut feststellbar. Da an ihrer Entstehung verschiedene Mutterzellen beteiligt sind, ist das Erbgut der Tochterzelllinien unterschiedlich. Man bezeichnet dies auch als polyklonal.

Ganz anders bei Lymphdrüsenkrebs. Der Ursprung der krankhaften Zellvermehrung ist hier die Entartung einer einzigen Zelle. Als Töchter dieser einzelnen Zelle haben daher



Feinnadelaspiration des Kniekehllymphknotens bei einem Hund mit einer Vergrößerung aller tastbaren Lymphknoten

Abkürzungen

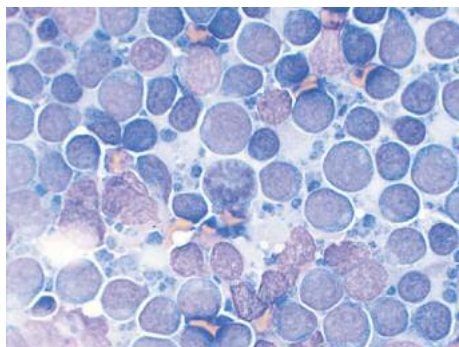
DNA: Desoxyribonukleinsäure; Erbgut-molekül im Zellkern.

PARR: PCR for Antigen Receptor Rearrangements; Erbgutanalyse, mit der monoklonale Lymphkrebiszellen von polyklonalen Lymphzellen unterschieden werden können.

PCR: Polymerasekettenreaktion; biochemisches Verfahren mit dem bestimmte Abschnitte des Erbgutes aufgefunden und gezielt vermehrt werden. Auf diese Weise können auch sehr kleine Probenmengen erfolgreich analysiert werden.

alle Krebszellen identisches Erbgut. Genau dies wird über die PCR for Antigen Receptor Rearrangements (PARR) nachgewiesen. Mithilfe spezieller Enzyme vermehrt die PARR durch die PCR (Polymerasekettenreaktion) gezielt jene Abschnitte im Erbgut von Lymphozyten, in denen sich diese Abwehrzellen individuell unterscheiden. Die Ergebnisse dieses Arbeitsschrittes sind die DNA-Abschnitte, die man auch PCR-Produkte nennt. Gleichzeitig hierzu werden diese DNA-Abschnitte mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. In einem weiteren Arbeitsschritt werden die DNA-Abschnitte sortiert. Während sich bei einer Lymphzellvermehrung im Rahmen einer Abwehrreaktion ein heterogenes Bild unterschiedlicher Abschnitte ergibt, erkennt man bei einem malignen Lymphom die Ansammlung identischer Erbgutabschnitte.

Die bislang bei einer PARR übliche Sortiermethode, die Gelelektrophorese, ist

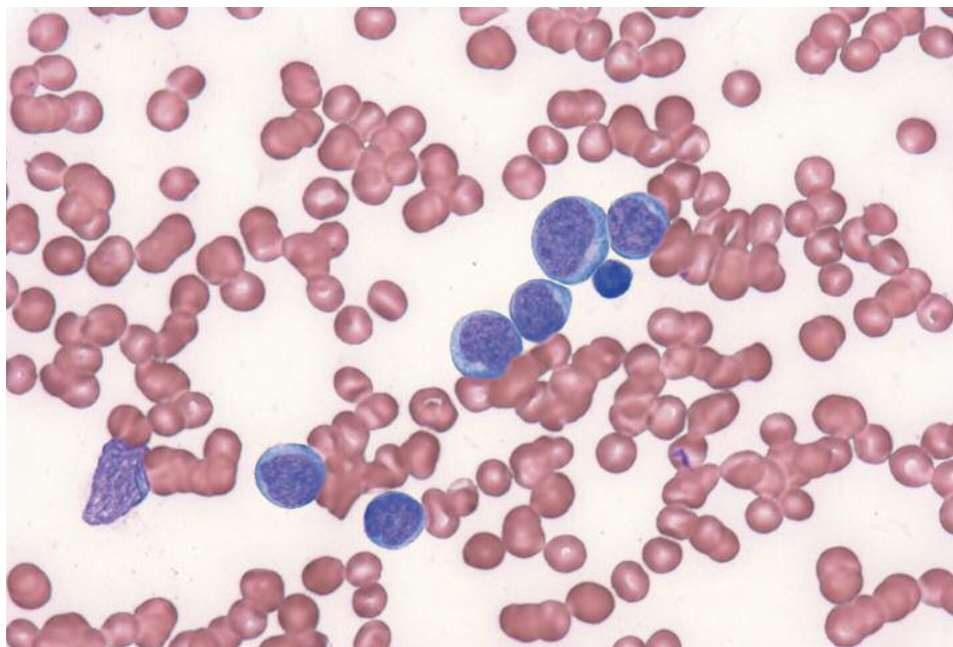


Durch eine Punktion gewonnenes Lymphknotenaspirat (Probe eines Lymphoms) im mikroskopischen Bild. Auffällig sind die riesigen Zellen. Es handelt sich um Lymphom, das viele Vorläuferzellen der Lymphozyten enthält (Lymphoblasten) und viele Zellteilungen (Mitosen) aufweist.

sehr aufwändig. Darüber hinaus kann es beim manuellen Übertragen der PCR-Produkte auf das Gel zu Verunreinigungen kommen. Im Rahmen einer Doktorarbeit unter Betreuung von Johannes Hirschberger wurde nun ein Verfahren erprobt, das weniger fehleranfällig ist und eine objektivere Auswertung ermöglicht.

Schmelzen statt wandern

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Abschnitte anhand ihrer Wandergeschwindigkeit in einem Gel unter Einfluss eines elektrischen Feldes sortiert. Zu Beginn der Elektrophorese wird die Probe (ein Gemisch



Blutausstrich eines leukämischen Patienten, der an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) leidet. Die roten Zellen sind rote Blutkörperchen. Rechts im Bild ein kleiner „normaler“ Lymphozyt. Die Tumor-Lymphozyten sind extrem groß.

verschiedener DNA-Abschnitte) auf den Startpunkt aufgetragen. Nach dem Anschalten des elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Abschnitte in Richtung der Anode, dem positiven Pol.

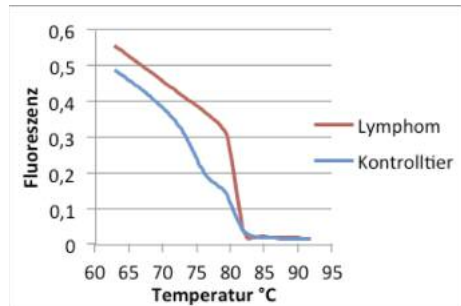
Je kleiner ein Erbgutabschnitt ist, desto leichter kann er durch das Gel gleiten und desto schneller wandert er in Richtung der Anode. Im Laufe der Zeit wird auf diese Weise das Gemisch getrennt: Die kleinsten und damit schnellsten Abschnitte sind am nächsten an der Anode, danach kommen in der Reihenfolge zunehmender Größe die anderen Abschnitte. Da identische DNA-Abschnitte gleich schnell sind, bilden sich bandenförmige Ansammlungen im Gel.

Im Falle eines Lymphoms sind die monoklonalen DNA-Abschnitte identisch und legen daher innerhalb einer bestimmten Zeit die gleiche Strecke im Gel zurück. Es entsteht eine einzelne, scharf abgegrenzte Bande. Bei einer polyklonalen Probe sind die DNA-Abschnitte unterschiedlich groß. Sie wandern daher unterschiedlich weit durch das Gel und es entstehen mehrere unterschiedlich starke und weniger scharf abgegrenzte Banden.

Die Schmelzkurvenanalyse basiert auf der Tatsache, dass DNA-Abschnitte je nach Größe und biochemischer Zusammensetzung bei unterschiedlichen Temperaturen schmelzen. Nach der Vermehrung und Fluoreszenzmarkierung der gesuchten DNA-Abschnitte werden diese schrittweise erhitzt. Sobald sie ihren Schmelzpunkt erreichen, zerfallen sie und geben den Fluoreszenz-

Farbstoff frei. Das Gerät zeichnet den Abfall an Fluoreszenz auf. Die monoklonalen DNA-Abschnitte bei Lymphom-Patienten haben alle denselben Schmelzpunkt, sodass es nach dessen Erreichen zu einem abrupten Fluoreszenzabfall bei einer minimalen Temperaturerhöhung kommt. Bei polyklonalen Proben hingegen schmelzen die verschiedenen Erbgut Abschnitte bei verschiedenen Temperaturen, so dass der Fluoreszenzabfall über einen sehr weiten Temperaturbereich erfolgt.

Diagramm: Schmelzkurvenanalyse der DNA-Abschnitte eines Lymphoms



Die rote Linie zeigt den steilen Abfall der Fluoreszenz in einem bestimmten Temperaturbereich (ca. 79°C). Hier sind identische DNA-Abschnitte in der Probe gleichzeitig geschmolzen. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass es sich um monoklonale DNA handelt und die Diagnose Lymphom. Die blaue Linie des Kontrolltiers verläuft kontinuierlichen aber unterschiedlich stark, weil die Moleküle in der Kontrollprobe unterschiedliche Schmelzpunkte hatten.

Schnell, genau, vielseitig

Die Kombination von PARR mit Schmelzkurvenanalyse wurde anhand der Proben von 34 Lymphom-Patienten untersucht. Als Kontrolle dienten die Proben von 29 Hunden mit einer Lymphdrüsen-Schwellung, die nachweislich nicht von einem Lymphom verursacht worden war. Zur Qualitätssicherung führte man darüber hinaus Negativkontrollen mit hochgereinigtem Wasser (ultra pure water) und Positivkontrollen mit Tumorzellen aus Zellkulturen durch.

Die Ergebnisse der Studie zeigen folgende Vorteile der Kombination von PARR mit einer Schmelzkurvenanalyse auf:

- Die Schmelzkurvenanalyse kann im gleichen Gerät vorgenommen werden wie die PCR und die Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoff. Hierdurch sind weniger manuelle Arbeitsschritte notwendig und die Wahrscheinlichkeit für Verunreinigungen der DNA ist geringer.
- Sie ist dabei mindestens so zuverlässig und genau wie die traditionelle Methode. In der vorliegenden Studie übertraf die Schmelzkurvenanalyse die Gelelektrophorese sogar an Genauigkeit. Die Münchner Wissenschaftler erklären dies damit, dass der individuelle Schmelzpunkt nicht nur von der Größe des DNA-Abschnittes abhängt, wie es bei der Gelelektrophorese der Fall ist, sondern auch von seiner biochemischen Zusammensetzung.

Im Rahmen der Studie entwickelten die Forscher darüber hinaus eine neue einfa-

chere Methode zur objektiven Auswertung der Schmelzkurve.

Insgesamt beurteilen die Forscher die PARR mit Schmelzkurvenanalyse als wertvollen Fortschritt für die Diagnostik des malignen Lymphoms beim Hund. Über die schnelle und sichere Diagnostik von Lymphomen hinaus erlaubt die Methode die Bestimmung des Tumors als B-Zell- oder T-Zelllymphom, was für die Prognose des Patienten von erheblicher Bedeutung ist. Des Weiteren ermöglicht das Verfahren eine gute Kontrolle des Krankheitsverlaufs und die Früherkennung von Rückfällen, weil es Tumorzellen im Blut bereits lange vor dem erneuten Wachstum der Lymphdrüsen entdecken kann.

(Barbara Welsch)

Titel der Studie

Lymphomdiagnostik beim Hund mittels Klonalitätsnachweis der Tumorzellen (PARR; PCR for Antigen Receptor Rearrangements) und Modifizierung des Verfahrens durch Einführung der Schmelzkurvenanalyse

Kontakt

Prof. Dr. Dr. habil.
Johannes Hirschberger
Diplomate ECVIM-CA, hon. Diplomate
ECVCP (Clinical Pathology)
Medizinische Kleintierklinik
Veterinärstr. 13
80539 München
Telefon +49 (0)89 / 2180-2640
hirschberger@lmu.de

Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung



**Forschung
für den Hund**

Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V.

Postfach 14 03 53

53058 Bonn

Service-Telefon 0180 / 3 34 74 94

info@gkf-bonn.de

www.gkf-bonn.de