

Michaela Fux¹, Eva Gfeller², Ulrike Bacher^{2,3}

Cytomics

Derzeit fasst man unter Cytomics die multiparametrische Durchflusszytometrie, Bio-Imaging und weitere Techniken wie Laser-Scan-Zytometrie (laser scanning cytometry) zusammen. Dabei wird oftmals die Bioinformatik zugezogen, um die molekulare Architektur und Funktionalität des Zellsystems zu beschreiben. Die multiparametrische Durchflusszytometrie bzw. Flowzytometrie gehört in der Hämatologie und Immunologie zu den diagnostischen Standardmethoden. In beiden Bereichen gewinnt die Methodik derzeit an Komplexität. Gleichzeitig wachsen die Anforderungen an eine individualisierte hämatologische und immunologische Diagnostik als Basis für optimale Therapieentscheidungen.

Standortbestimmung für die Durchflusszytometrie in der Diagnostik

Die Geräteapplikationen für die durchflusszytometrische Routinediagnostik befinden sich in einer Umbruchssituation hin zur Akquise von mehreren Millionen Zellereignissen pro Analyse. Anhand der derzeit eingeführten Gerätegenerationen können bis zu 8–10 Fluorochrome bzw. 10–12 Parameter in einem durchflusszytometrischen Assay kombiniert werden.

Hämatologie

In der Hämatologie stellt die Durchflusszytometrie eine Basismethode zur Diagnosestellung und Festlegung der Linienzugehörigkeit bei akuten Leukämien dar. Dabei interagiert die Durchflusszytometrie mit anderen Methoden wie Zytomorphologie, Histopathologie, Zyto- und Molekulargenetik. Bei akuten lymphatischen Leukämien (ALL) wird der Reifegrad bestimmt. Ferner eignet sich die Methode zur Detektion der «minimal residual disease» (MRD) in der Verlaufsdagnostik für Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und ALL. Die Durchflusszytometrie ist auch für die Diagnose einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) sowie für weitere Lymphome der B-Zell- und T-Zell-Reihe sehr relevant. Bei B-Zell-Lymphomen kommt der Erkennung einer Leichtkettenrestriktion eine hohe Bedeutung zu. Bei T-Zell-Lymphomen sind ein Markerverlust oder eine aberrante Expression von Antigenen relevant. Beim Multiplen Myelom ist der Beitrag der Durchflusszytometrie bei Diagnosestellung additiv zu sehen; jedoch gewinnt die MRD-Diagnostik derzeit an Stellenwert für die Festlegung der weiteren Myelomtherapie im Verlauf.

Immunologie

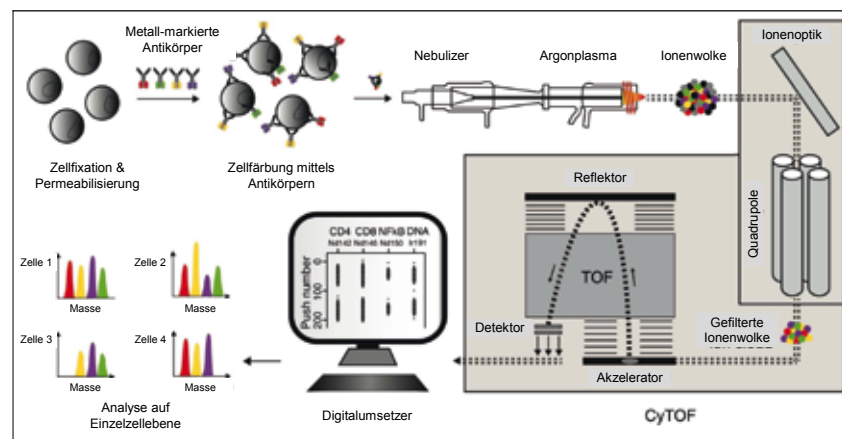
Einfache Immunstaten mit Angabe der wichtigsten Lymphozytensubpopulationen (in der Regel B-, T-, NK-Zellen) werden vielerorts bereits mit einem hohen Mass an Automatisierung durchgeführt. Komplexe Immunstaten beziehen darüber hinaus verschiedene Reife- und Aktivierungsstadien der Lymphozyten ein. Der Durchflusszytometrie kommt dabei eine Schlüsselrolle in der Diagnostik primärer und sekundärer Immundefizienzen zu. Bei primären Immundefizienzen sind vornehmlich CVIDs (chronic variable immunodeficiencies) zu nennen, bei sekundären Immundefizienzen Patienten mit HIV-Erkrankung oder Patienten unter immunsuppressiver oder onkologischer Therapie.

Einbettung in multidisziplinäre Konzepte

Die Durchflusszytometrie ist in der hämatologischen und immunologischen Diagnostik in multidisziplinäre Konzepte eingebunden. Für die Indikation

zu den jeweiligen Untersuchungen und die Auswahl der Antikörperpanel sind die Angaben der Kliniker, die Laborbefunde aus der Hämatologie, klinischen Chemie, Serologie und Proteindiagnostik, sowie eventuell bereits vorliegende Spezialdiagnostik aus anderen Disziplinen relevant (z.B. Zytomorphologie, Histopathologie). Gleichermassen müssen die Befunde der Durchflusszytometrie an andere diagnostische Rubriken kommuniziert werden, damit die entsprechende Diagnostik wie Zytogenetik oder Molekulargenetik veranlasst werden kann.

Beispielhaft kann die Detektion einer Leukozytose von 80 G/L im peripheren Blut in Verbindung mit «Blastenalarm» durch den hämatologischen Analyser genannt werden. Die mikroskopische Untersuchung zeigt einen Anteil von 80% Blasten mit am ehesten myeloischem Charakter angesichts feiner Granula im Zytoplasma. Daraufhin wird eine Durchflusszytometrie aus dem peripheren Blut initiiert, die eine Leukä-



Schematische Darstellung des Ablaufs der CyTOF-Technologie. Die Zellen werden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern markiert, die mit reinen Metallisotopen definierter Masse konjugiert sind. Anschliessend werden die Zellen in einem heissen Argonplasma vernebelt, ionisiert und zerstäubt und in das Massenzytometer, ein hybrides Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer, eingebracht. Hier werden die Zusammensetzung und Menge der Reporter-(Metall-)Isotope bestimmt. Die den Isotopen entsprechenden Signale werden dann mit dem Vorhandensein des jeweiligen Markers pro Einzelzellereignis korreliert (Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Bernd Bodenmiller, Zürich).

1 Universitätsinstitut für Klinische Chemie;
 2 Zentrum für Labormedizin;
 3 Klinik für Hämatologie und Hämatologisches Zentrallabor; Inselspital, Universitätsspital, Universität Bern

Cytométrie

Actuellement, le terme «cytométrie» recouvre la cytométrie en flux à plusieurs paramètres, la bio-imagerie et d'autres techniques comme la cytométrie à balayage laser (laser scanning cytometry). Il est souvent fait appel à la bio-informatique pour décrire l'architecture moléculaire et la fonctionnalité du système cellulaire. En hématologie et en immunologie, la cytométrie en flux à plusieurs paramètres respectivement la cytométrie de flux fait partie des méthodes de diagnostic standard. Dans ces deux domaines, la méthodologie devient actuellement de plus en plus complexe. Dans le même temps, les exigences concernant un diagnostic hématologique et immunologique individualisé augmentent pour permettre la prise de décisions optimales en matière de thérapie.

miezellpopulation mit abgeschwächter Expression von CD45 und Expression myeloischer Marker wie CD117, Myeloperoxidase, CD13, CD33, und (asynchron) CD15 zeigt, ferner werden CD34 und HLA-DR exprimiert. Lymphatische und monozytäre Marker sind negativ. Somit kann die Diagnose einer AML mit rein myeloischer Komponente gestellt werden. Zur weiteren Charakterisierung werden eine Chromosomenanalyse im zytogenetischen Speziallabor und ein Screening auf rezurrenente molekulare Mutationen bei AML (u.a. FLT3, NPM1, IDH1/IDH2-Mutationen) im hämatologischen Molekularlabor veranlasst. Für eine akute Promyelozytenleukämie ergibt sich morphologisch und auch in der Durchflusszytometrie kein Hinweis, sodass keine Indikation zu einem notfallmässigen Screening auf PML-RARA besteht (PML-RARA wäre das molekulare Korrelat dieses spezifischen AML-Subtyps mit häufigen schweren thrombembolischen und hämorrhagischen Komplikationen). Die Chromosomenanalyse ergibt den Nachweis einer isolierten Translokation t(8;21) mit dem RUNX1-RUNX1(= AML1-ETO-) Rearrangement, sodass für den Patienten eine intensive Induktions- und Konsolidationschemotherapie geplant wird. Nach Erreichen einer hämatologischen kompletten Remission wird die MRD-Diagnostik anhand der Durchflusszytometrie und der Realtime-PCR auf das RUNX1-RUNX1-Rearrangement durchgeführt. Beide Methoden verzeichnen nach wenigen Monaten ein erfreuliches Ansprechen auf die Therapie bzw. doku-

mentieren MRD-Negativität. Eine allogene Stammzelltransplantation in erster kompletter Remission ist bei diesem Patienten somit nicht erforderlich.

Identifikation von Targets für Immuntherapien

Eine besondere Herausforderung ergibt sich in der durchflusszytometrischen Verlaufsdagnostik akuter Leukämien durch neue immuntherapeutische Ansätze. Blnatumomab besteht aus antigenbindenden Fragmenten zweier Antikörper, die sich gegen CD19 auf der B-Zell-Oberfläche sowie gegen den T-Zell-Marker CD3 richten. Im Verlauf können resistente B-Zell-Leukämiepopulationen den Pan-B-Zellmarker CD19 durch das Phänomen einer Immunevasion verlieren. Als weiteres neues immuntherapeutisches Konzept kann Inotuzumab Ogamizin genannt werden. Dieses Antikörper-Wirkstoff-Konjugat enthält den B-Zell-Antikörper Inotuzumab, der CD22 bindet. Dieser ist über einen Linker mit dem niedermolekularen Zytostatikum Calicheamicin verbunden, das intrazellulär freigesetzt wird. Somit gewinnt die Detektion einer Expression von CD22 als Target bei akuten Leukämien der B-Linie bei Therapieresistenz oder im Rezidiv an Bedeutung. Dies ist nur ein Beispiel aus der rasch expandierenden Kaskade neuer Immuntargets in der Hämatookologie.

Innovationen in der durchflusszytometrischen Diagnostik

Moderne Durchflusszytometer für den routinediagnostischen Einsatz ermöglichen aufgrund der Applikation einer höheren Zahl von Lasern die Kombination von bis zu 8 bis 10 Fluorochromen bzw. Antikörpern in einem Assay. Anhand der sogenannten Bulk-Lyse können höhere Zellzahlen generiert werden. Daraus resultiert insbesondere für die Verlaufsdagnostik akuter Leukämien oder lymphoproliferativer Neoplasien (CLL, Multiples Myelom) eine höhere Sensitivität mit der Möglichkeit, wesentlich mehr Zellereignisse mit einem bei Erstdiagnose charakterisierten Leukämie-assoziierten Immunphänotyp (LAIP) zu erfassen. Somit kann die MRD-Diagnostik verbessert zur Steuerung der Therapie bei Patienten mit einer AML einbezogen werden. Internationale Arbeitsgruppen wie EuroFlow

bemühen sich um Standardisierungen der Antikörperpanel bei Erstdiagnose und im Krankheitsverlauf.

Beim Multiples Myelom stehen Konzepte des Next-Generation-Flow (NGF) für die Verwendung ausgedehnter Antikörperpanel, einen 2-Tube-8-Color-Approach, die Applikation der Bulk-Lyse, und die automatisierte Identifikation von Zellen mit aberranten Expressionsmustern im Vergleich zu Referenzdatenbanken mit den Daten normaler Knochenmarkproben. Dies ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität von 10⁻⁵ bis 10⁻⁶ insbesondere für die Verlaufsdagnostik.

Ein weiterer innovativer Ansatz wird derzeit auf seine klinische Anwendbarkeit in wissenschaftlichen Projekten geprüft: Die CyTOF-Technologie kombiniert die Durchflusszytometrie mit der Time-of-Flight-Massenspektrometrie (Abbildung 1). Diese Technik erlaubt die umfassende Einzelzellanalyse anhand weitaus grösserer Spektren von isotopgebundenen Antikörpern und unterliegt im Unterschied zur traditionellen Flowzytometrie nicht der Limitation durch spektralen Overlap. Bislang wurde diese neue Technologie nur an wenigen Zentren bzw. Forschungseinrichtungen begonnen.

Zusammenfassend ist die Durchflusszytometrie in der hämatologischen und immunologischen Diagnostik angesichts der wachsenden Bedeutung der Präzisionsmedizin mit einer Fülle neuer Herausforderungen konfrontiert. Gleichzeitig erlauben die technischen Neuerungen für die Routinediagnostik eine deutliche Steigerung der Effizienz und Sensitivität. Innerhalb grösserer Kliniken oder Institute kann die interdisziplinäre Integration unterschiedlicher Durchflusszytometrie-Plattformen eine Chance sein, technische Neuerungen rascher in Synergie umzusetzen und schwierige Befunde im grösseren Rahmen zu besprechen und zuzuordnen. Beispielhaft kann die Integration hämatologischer und immunologischer Durchflusszytometrie genannt werden. Somit gewinnen interdisziplinäre Ansätze auch für die diagnostische Durchflusszytometrie an Bedeutung.

Korrespondenz
Veraulrike.Bacher@insel.ch

Referenzen online auf sulm.ch/pipette