

Aus der Klinik für Dermatologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekularbiologische Identifizierung und
immunophänotypische Charakterisierung
der malignen Zellen beim Sézary Syndrom
unter Berücksichtigung von Klinik und
Prognose**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Herr Sebastian Schöpp

aus Berlin

Dekane: Prof. Dr.med. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Univ.-Prof. Dr.med. H. Abken

2. PD Dr.rer.nat. A. Lukowsky

3. Prof. Dr.med. C. Neumann

Datum der Promotion: 27. September 2004

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	7
1.1	Definition kutaner Lymphome und des Sézary Syndroms	7
1.1.1	Definition kutaner Lymphome	7
1.1.2	Das Sézary Syndrom	8
1.2	Pathogenese	9
1.3	Klinik und Paraklinik des Sézary Syndroms	11
1.4	Diagnostik des Sézary Syndroms	12
1.4.1	Histopathologie	12
1.4.2	Zytogenetik	12
1.4.3	Immunophänotypisierung und Durchflußzytometrie	13
1.4.3.1	<i>Zellsortierverfahren und Flowzytometrie</i>	13
1.4.3.2	<i>T-Zell Phänotyp in den verschiedenen Entwicklungsstadien von T-Zellen</i>	14
1.4.3.3	<i>Immunophänotyp des Sézary Syndroms</i>	14
1.4.3.4	<i>Das Oberflächenantigen CD7</i>	16
1.4.3.5	<i>Das Oberflächenantigen CD26</i>	17
1.4.4	Molekularbiologie	19
1.4.4.1	<i>Klonalitätsnachweis durch Southern Blot</i>	20
1.4.4.2	<i>Klonalitätsanalyse mittels PCR</i>	20
1.4.4.3	<i>Klonalitätsnachweis und Therapie-Monitoring mit Hilfe quantitativer PCR-Analyse</i>	21
1.5	Therapie, Prognose und prognostische Faktoren	22
1.5.1	Therapie des Sézary Syndroms	22
1.5.2	Prognose und prognostische Faktoren	23
2	<i>Problemstellung</i>	25
3	<i>Material und Methoden</i>	26
3.1	Geräte und Chemikalien	26
3.1.1	Geräte	26
3.1.2	Chemikalien	26
3.2	Patienten/ Proben	27
3.3	Präparation und Lagerung der PBMC	28
3.3.1	Gewinnung der PBMC	28
3.3.2	Lagerung der PBMC	28
3.3.3	Mikroskopische Zellzahlbestimmung	29

3.4 Zellfärbung, FACS und Zellsortierung	29
3.4.1 Zellfärbung	29
3.4.2 Fluoreszenzmessung am Durchflußzytometer	30
3.4.3 Zellsortierung mittels <i>CellSorter</i>	31
3.5 DNA-Extraktion/ Konsensus PCR/ TCR-β-PCR/ Agarosegelelektrophorese/ TGGE	31
3.5.1 DNA-Extraktion	31
3.5.2 TCR-γ-PCR	31
3.5.3 TCR-β-PCR	32
3.5.4 PCR-Programme	32
3.5.5 Agarosegelelektrophorese	33
3.5.6 Temperaturgradientengelelektrophorese (HD-TGGE-PAGE)	33
3.6 PCR-Produktaufreinigung/ Re-PCR/ Klonierung/ Sequenzierung/ klonspezifische Primer	34
3.6.1 PCR-Produktaufreinigung	34
3.6.2 Re-PCR	34
3.6.3 Klonierung	34
3.6.4 Sequenzierung	35
3.6.5 klonspezifische Primer	35
3.7 quantitative PCR	36
3.7.1 Herstellung eines klonspezifischen Standards	36
3.7.2 Die quantitative PCR im LightCycler®	37
4 Ergebnisse	39
4.1 FACS-Analysen an mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit Sézary Syndrom	39
4.1.1 CD7-Expression peripherer CD3 ⁺ Lymphozyten	39
4.1.2 CD26 Expression peripherer CD3 ⁺ Lymphozyten	42
4.1.3 Korrelation der CD7 und CD26 Expressionsmuster	43
4.2 Qualitative PCR-Analysen an PBMC von Sézary Syndrom Patienten	45
4.2.1 TCR-γ-PCR	45
4.2.2 TCR-β-PCR	45
4.2.3 Patientenspezifische PCR	46
4.3 Quantitative PCR-Analysen an PBMC von Patienten mit Sézary Syndrom	50
4.3.1 Entwicklung der PCR-Bedingungen für eine quantitative PCR im LightCycler®	50
4.3.2 Quantifizierung der CD7 ⁺ und CD7 ⁻ Fraktion	51
4.3.3 Quantifizierung der CD26 ⁺ und CD26 ⁻ Fraktion	54

4.3.4	Korrelation der PCR- und FACS-Ergebnisse	56
4.4	Korrelation der Analysen mit klinischen Befunden	58
4.4.1	Klinische und paraklinische Befunde	58
4.4.2	Betrachtung der Daten im Zusammenhang zum klinischen Verlauf	61
4.5	Zusätzliche Aspekte der FACS-Analysen	62
4.5.1	Ungewöhnliche Expressionsmuster von CD7 und CD26 auf peripheren Lymphozyten	62
4.5.2	Koexpression von CD7 und CD26 auf peripheren Lymphozyten	63
5	Diskussion	65
5.1	Methodik	65
5.1.1	FACS-Analyse und Zellsortierung	65
5.1.2	Entwicklung und Spezifität klonspezifischer Primer	67
5.1.3	Quantitative PCR	69
5.2	Ergebnisse	73
5.2.1	CD7 und CD26 Expression beim Sézary Syndrom	73
5.2.1.1	CD7 Expression beim Sézary Syndrom	74
5.2.1.2	CD26 Expression beim Sézary Syndrom	75
5.2.1.3	CD7, CD26 Koexpression beim Sézary Syndrom	76
5.2.2	Präsenz des T-Zell-Klons in den CD7 ⁺ , CD7 ⁻ und CD26 ⁺ , CD26 ⁻ Populationen	77
5.2.3	Korrelation der FACS-Daten und der Daten der Quantifizierung	81
5.2.4	<i>dim</i> -Expression von CD3	83
5.3	Prognostische und diagnostische Relevanz der Ergebnisse zur Tumorlast, CD7 Expression, CD26 Expression in Bezug zur Klinik und Therapie	84
5.3.1	CD7 und CD 26 Expression in Korrelation zu klinischem Status und Therapie	84
5.3.2	CD7 und CD26 Expression in Korrelation zum Überleben der Patienten	85
5.3.3	Diskussion des Zusammenhangs zwischen den weiteren klinischen und paraklinischen Parametern und der Prognose des Sézary Syndroms	87
6	Zusammenfassung und Thesen	88
6.1	Zusammenfassung	88
6.2	Thesen	90
	Literatur	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
C	konstant
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma/ kutanes T-Zell-Lymphom
CD	cluster of differentiation
cons	konsensus
D	diversity
DNA	desoxyribonucleid acid
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPPIV	Dipeptityl Peptidase IV
ECP	extracorporale Photopherese
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	inducable protein
J	joining
k.W.	kein Wert bestimmt
LDH	Laktatdehydrogenase
MF	Mycosis Fungoides
k.P.	kein Produkt
k.R.	kein Resultat
NK	Natürliche Killerzellen
PAS	p-Aminosalicylsäure
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
TH-1, TH-2	T-Helfer-Zelle Typ 1, T-Helfer-Zelle Typ2
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
PUVA	Psoralen plus UltraViolett-A
V	variable
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Definition kutaner Lymphome und des Sézary Syndroms

1.1.1 Definition kutaner Lymphome

Kutane T-Zell Lymphome sind Neoplasien des Immunsystems, charakterisiert durch eine klonale Expansion von T-Lymphozyten in der Haut (Willemze et al. 1997, Fritsch 1998, Dummer et al. 2001). Sie sind mit 65% der kutanen Lymphome die häufigsten Lymphome der Haut und haben eine Inzidenz von 0,5 bis 1/100000 pro Jahr (Burg et al. 1994, Willemze et al. 1997). Kutane T-Zell Lymphome unterscheiden sich in klinischen und histologischen Merkmalen, dem klinischen Verhalten und der Prognose von primär nodalen Lymphomen, welche die Haut sekundär befallen haben (Willemze et al. 1997, Willemze und Meijer 1999). Diesem Unterschied werden neuere Klassifikationen wie die EORTC-Klassifikation primär kutaner Lymphome und die WHO-Klassifikation gerecht (Harris et al. 1994, Willemze et al. 1997, Jaffe et al. 1999). Die EORTC-Klassifikation beinhaltet nur primär kutane Lymphome. Es werden primär kutane T-Zell Lymphome von primär kutanen B-Zell Lymphomen unterschieden. Ein kutanes T-Zell Lymphom ist definiert als ein Non-Hodgkin Lymphom der Haut, bei dem zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und für die folgenden sechs Monate keine extrakutane Manifestation nachgewiesen werden kann. Eine Sonderstellung nehmen die Mycosis Fungoides und das Sézary Syndrom ein, da diese bereits bei Diagnosestellung eine Lymphknoten- bzw. Blutbeteiligung zeigen können (Willemze et al. 1997).

Ein Vergleich der Klassifikation von WHO und EORTC ist in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Tabelle beinhaltet nur die Entitäten, die mit einer Entartung von T-Zellen/ NK-Zellen assoziiert sind. In der Klassifikation der EORTC werden die Mycosis Fungoides und das Sézary Syndrom als zwei unterschiedliche Erkrankungen gewertet, und die Mycosis Fungoides in drei Subtypen unterschieden. Hingegen wird in der WHO-Klassifikation von Mycosis Fungoides/ Sézary Syndrom gesprochen (Fink-Puches et al. 2002).

Tab. 1: Vergleich der Klassifikation der EORTC und der WHO

EORTC – Klassifikation	WHO – Klassifikation
Mycosis fungoides Mycosis fungoides assoziiert mit Mucinosis follicularis Pagetoide Retikulose	Mycosis fungoides/ Sézary Syndrom
Sézary Syndrom	Sézary Syndrom
Lymphomatoide Papulose ----- Großzelliges CD30 ⁺ CTCL	Anaplastisches großzelliges Lymphom, primär kutaner Typ
CTCL, pleomorph, klein / mittelgroßzellig ----- Großzelliges CD30 ⁻ CTCL	peripheres T-Zell Lymphom, nicht anders charakterisiert ----- NK/T-Zell Lymphom
Subkutanes Panniculitis-like T-Zell Lymphom	Subkutanes Panniculitis-like T-Zell Lymphom

nach (Fink-Puches et al. 2002)

1.1.2 Das Sézary Syndrom

Das klinische Bild einer Mycosis fungoides wurde 1806 in einer Fallbeschreibung von Alibert erstmalig geschildert. Im Jahre 1892 erfolgte die Beschreibung der Erythrodermie-Variante (Bsnier und Hallopeau 1892). Die uns heute als Sézary Syndrom bekannte Krankheit wurde 1938 von Sézary und Bouvrain beschrieben. Sie stellten die klinischen Merkmale einer Erythrodermie, eines heftigen Pruritus, einer Lymphadenopathie und mononukleärer Zellen mit abnormal geschlungenen Zellkernen fest (Sézary und Bouvrain 1938). Taswell und Winkelmann gaben dieser Entität den Namen Sézary Syndrom (Taswell und Winkelmann 1961). Die Elektronenmikroskopie ermöglichte es Lutzner und Jordan, 1968 in den Tumorzellen einen hochgradig verschlungenen Kern nachzuweisen (Lutzner und Jordan 1968). Immunologische Beobachtungen in den siebziger Jahren identifizierten das Sézary Syndrom als ein Malignom der T-Zellen und Edelson schlug 1975 als erster vor, die Mycosis fungoides, das Sézary Syndrom und verwandte Entitäten unter dem Oberbegriff kutane T-Zell Lymphome zusammenzufassen (Edelson 1980).

Heute ist das Sézary Syndrom definiert als ein kutanes T-Zell Lymphom mit den klinischen Zeichen einer Erythrodermie (*homme rouge*), Lymphadenopathie und leukämischer Aussaat von Lymphozyten, mit einem cerebriformen Nukleus (Lutzner Zellen, Sézary-Zellen) (Dummer et al. 1994, Isaacson und Norton 1994, Willemze et al. 1997, Fritsch 1998). Als weitere wichtige Kriterien gelten heute eine Sézary-Zellzahl von >1000/µl, eine CD4/CD8 Ratio größer als zehn und ein Klonalitätsnachweis in der im Blut zirkulierenden Population der T-Lymphozyten (Fritsch 1998, Scarisbrick et al. 2001, Vonderheid et al. 2001).

Die Inzidenz wird von Bernengo et al. mit 0,56 pro eine Million Einwohner angegeben. Das Manifestationsalter liegt in der sechsten bis siebenten Lebensdekade (Bernengo et al. 1998).

1.2 Pathogenese

Die Ätiologie und die Pathogenese des Sézary Syndroms sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass eine Reihe von Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung der Krankheit haben. Diese können folgenden drei Gruppen zugeordnet werden: 1) genetische Faktoren inklusive chromosomale Abnormalitäten, 2) Umwelteinflüsse und infektiöse Faktoren und 3) immunologische Faktoren.

Genetische Analysen zeigten eine Assoziation mit HLA-DR5 und HLA-DQB1*0. Eine familiäre Häufung ist ebenfalls in der Diskussion (Dummer et al. 2000).

Die Chromosomenanalyse von Zellen aus CTCL ergab eine Vielzahl struktureller und numerischer Veränderungen. Jedoch konnte keine konsistente Pathologie identifiziert werden. Die Beobachtungen zeigten dabei eine gesteigerte Zahl von Aberrationen auf den Chromosomen 3, 6, 8, 9, 11, 13 und 17. Auf all diesen Chromosomen wird das Vorhandensein von Onkogenen und/ oder Tumorsuppressorgenen diskutiert bzw. konnte deren Existenz nachgewiesen werden. Eine Inaktivierung des Gen p53, einem Tumorsuppressorgen, ist die verbreitetste Abnormalität humaner Malignome und konnte beim Sézary Syndrom ebenfalls nachgewiesen werden. Eine weitere Veränderung betrifft die Tumorsuppressorgene p15 und p16. Veränderungen an diesen, auf dem Chromosom 9q21 lokalisierten Genen, wurden in 75% der Fälle mit Sézary Syndrom gezeigt (Whittaker 2001).

Immer wieder wurde der Einfluss von Umweltreizen/ -noxen in der Entstehung von CTCL diskutiert. Es konnte jedoch kein erhöhte Inzidenz kutaner T-Zell Lymphome bei Exposition gegenüber industriellen Noxen gezeigt werden. Auch der Verdacht einer atopischen Diathese bei Patienten mit CTCL kann nicht aufrecht erhalten werden (Edelson 1980, Wieselthier et al. 1990).

Als pathogenetische Faktoren von CTCL sind virale Infektionen untersucht worden. Der Zusammenhang zwischen der Entstehung eines CTCL und der Infektion mit dem HTL-Virus Typ 1 musste jedoch bisher ausgeschlossen werden. Kontrovers diskutiert wird eine Infektion mit EBV (Dummer et al. 2000).

Die Immunologie kutaner Lymphome geht einher mit einer dysregulierten Synthese von Zytokinen. Normalerweise existiert eine Ausgewogenheit zwischen T-Lymphozyten mit TH-1-Profil und TH-2-Profil. Erreicht wird dieses Gleichgewicht durch den wechselseitigen Einfluss der sezernierten Zytokine.

Beim Sézary Syndrom wird eine Verschiebung des Zytokinmusters von TH-1, IL-2 und INF- γ dominiert, hin zu einem TH-2-Profil, welches durch die Dominanz von IL-5 und IL-10 gekennzeichnet ist, beobachtet (Lee et al. 1999, Dummer et al. 2001). Da die Tumorzellen ein TH-

2-Muster an Zytokinen sezernieren, wird die TH-1-Population der T-Lymphozyten gehemmt und es erfolgt mit dem Voranschreiten der Krankheit eine Abnahme der INF- γ produzierenden Zellen. Desweiteren wird ein Defekt in der Signaltransduktion nach INF- γ Stimulation in den Tumorzellen des Sézary Syndrom vermutet. Daraus resultiert eine „Resistenz“ der Tumorzellen gegenüber INF- γ . Diese Konstellation erklärt die Symptomatik des Sézary Syndroms und darüber hinaus möglicherweise die reduzierte Typ IV Allergiereaktion, die Eosinophilie und das erhöhte Risiko für weitere Malignome (Lee et al. 1999, Dummer et al. 2000, Dummer et al. 2001).

Immunologisch markant ist auch eine variable Expression von T-Zell Oberflächenantigenen. Die klonal expandierten T-Lymphozyten im Sézary Syndrom weisen den Verlust von Oberflächenmolekülen auf. Beachtung hat hier vor allem der Verlust des CD7 und des CD26 gefunden.

Der Verlust des CD7-Antigen geht einher mit dem Anstieg von CD60 und CD45RO, also einer Expansion von Gedächtnis-Zellen. Es kommt weiterhin zu einer Expansion von CD26⁻ und CD45RA⁻ Zellen. *Skin-Homing*-Antigene wie das Integrin VLA4 (= CD49d) werden weniger exprimiert (Scala et al. 1999).

Für den Epidermotropismus werden eine Reihe von Zytokinen verantwortlich gemacht, so das IP-10, IL-1, IL-7, IL-15 und IL-16. Dabei wird dem IP-10 und dem IL-15, zwei von Keratinozyten synthetisierten und sezernierten Proteinen, eine chemotaktische Wirkung auf CD4⁺ T-Lymphozyten zugeschrieben. Das IL-15 hat zusätzlich den Effekt, die Transkription von bcl-2 zu erhöhen. Dies führt zu einer verminderten Apoptoserate in den Tumorzellpopulationen (Dummer et al. 2000).

Dummer et al. haben ein zusammenfassendes Model zur Lymphomgenese entwickelt. Darin wird eine latente Phase beschrieben, gefolgt von einer frühen CTCL-Phase bis zum Vollbild eines CTCL. In der latenten Phase wird eine chronische Stimulation der T-Lymphozyten vermutet, eventuell im Zusammenhang mit einem persistierenden Superantigen. Desweiteren wirken auf die T-Lymphozyten die der Epidermis entstammenden Viabilitätsfaktoren IL-15 und IP-10. Die Lymphozyten zeigen eine geringe Proliferationsrate und exprimieren überwiegend einen Gedächtniszell-Phänotyp. Unter dem Einfluss bzw. durch den Ausfall der Zellzyklusregulatoren (p53, p15, p16 und bcl-2) kommt es zu einer gestörten Apoptose und dem frühen Stadium des CTCL. Die T-Lymphozyten synthetisieren jetzt TH-2-Profil Zytokine und zeigen eine INF- γ Resistenz. Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren (stats) und Onkogene (ras, c-myc) führt zum fortgeschrittenen Stadium des Lymphoms. Hier zeigen die Lymphozyten eine erhöhte Proliferationsrate. Der Wechsel zwischen den Stadien geht einher mit einer zunehmenden Immunsuppression (Dummer et al. 2001).

1.3 Klinik und Paraklinik des Sézary Syndroms

Die Klinik des Sézary Syndroms ist gekennzeichnet durch eine Erythrodermie, eine Lymphadenopathie und Pruritus. Dieser Pruritus kann von den Patienten als mild, ca. 22%, moderat, 56%, bis stark, 21%, empfunden werden.

Die Paraklinik des Sézary Syndroms ist geprägt durch eine hämatologische Aussaat des Tumors, eine erhöhte Sézary-Zellzahl im Blut und eine zugunsten der CD4⁺ Zellen verschobene CD4/CD8 Ratio (Wieselthier et al. 1990, Bernengo et al. 1998).

Scarlsbrick et al. entwickelten in Anlehnung an die EORTC und die ISCL ein hämatologisches Staging-System für Patienten mit CTCL und Erythrodermie. Dieses beinhaltet fünf hämatologische Stadien H0 bis H4. Die Kriterien sind in der Tabelle 2 dargestellt (Scarlsbrick et al. 2001). Patienten mit Sézary Syndrom können den Stadien H2 bis H4 zugeordnet werden (Russel-Jones und Whittaker 2000).

Tab. 2: Stadien der hämatologischen Beteiligung beim Sézary Syndrom

hämatologisches Stadium	PCR Analyse des TCR-Gen	Anzahl der Sézary-Zellen in %	Absolute Sézary-Zellzahl x10 ⁹ Zellen pro l
H0	polyklonal	0	0
H1	Klonal	< 5	0
H2	Klonal	> 5	< 1
H3	Klonal	> 5	1 – 10
H4	Klonal	> 5	> 10

(Scarlsbrick et al. 2001)

Zusätzlich zur klassischen Trias, Erythrodermie, leukämische Aussaat und Lymphadenopathie, können bei Patienten mit Sézary Syndrom weitere Effloreszenzen auftreten. Zu diesen zählen palmoplantare Hyperkeratosen in 72,6%, Onychodystrophie in 66,1% und eine Facies leonina bei 12,9% der Patienten. Fälle mit einer sekundären Infektion durch Herpes simplex Viren Typ 1 (eventuell auch 2) sind beschrieben worden (Bernengo et al. 1998). Lichenifikationen mit Bildung sehr schmerzhafter Fissuren und Ödeme wurden ebenfalls beobachtet.

Zu weiteren klinischen Symptomen des Sézary Syndroms gehört ein Ektropium bei 51,6% und eine Hepatosplenomegalie bei 33% der Patienten (Bernengo et al. 1998).

Eine Progression von klassischer Mycosis fungoides zu Sézary Syndrom sei möglich (Bernengo et al. 1998). Es wird angegeben, dass ca. 15% der Patienten mit MF ein Sézary Syndrom entwickeln (Kukel et al. 1994).

1.4 Diagnostik des Sézary Syndroms

Unter Umständen kann es für den behandelnden Arzt schwierig sein, ein Sézary Syndrom zu diagnostizieren. Die Erythrodermie, ein Hauptmerkmal des Sézary Syndroms, wird auch von anderen Krankheiten als Symptom gezeigt. Ursache für eine benigne Erythrodermie kann ein Arzneimittlexanthem, eine Psoriasis, eine atopische Dermatitis, die Pityriasis rubra pilaris, eine generalisierte idiopathische Erythrodermie (*Red man syndrome*) aber auch eine paraneoplastische Reaktion auf einen extrakutanen Tumor sein. Erschwerend kommt hinzu, dass kein klinisches Symptom pathognomonisch für das Sézary Syndrom ist. Deshalb ist neben der klinischen Untersuchung eine histopathologische, immunologische und molekularbiologische Untersuchung notwendig um die Diagnose eines Sézary Syndroms zu sichern (Wieselthier et al. 1990).

1.4.1 Histopathologie

Die histopathologische Untersuchung umfasst die Beurteilung von Hautbiopsaten und Blutaussstrichen.

Das Vorhandensein von Lymphozyten mit cerebriformen Nucleus im Blut ist für das Sézary Syndrom typisch (Lutzner und Jordan 1968, Edelson und Lutzner 1974, Meyer et al. 1977). Im Elektronenmikroskop imponieren diese Zellen mit einer hohen Kern/ Zytoplasma Ratio, tiefen Einziehungen des Nucleus, einem verdichteten Chromatin und wenigen Organellen an der Membran und im Zytoplasma (Lutzner und Jordan 1968, Meyer et al. 1977).

Präparate aus der Haut von Sézary Syndrom Patienten zeigen in der Hämatoxylin-Eosin Färbung Infiltrate mit atypischen Lymphozyten. Diese Lymphozyten haben einen cerebriformen Nucleus und bilden ein dichtes, bandähnliches Infiltrat in der Dermis. Darüber hinaus gruppieren sich diese atypischen Zellen in der Epidermis zu so genannten Pautrier'schen Mikroabszessen. Diese sind hilfreich zur Diagnosesicherung, jedoch kein Beweis für das Vorliegen eines Sézary Syndroms, da andere Erkrankungen der Haut, z.B. das Merkelzellkarzinom, ähnliche histologische Phänomene zeigen können (Buechner und Winkelmann 1983, Wieselthier et al. 1990).

1.4.2 Zytogenetik

Eine zytogenetische Untersuchung kann im Einzelfall hilfreich sein, es hat sich jedoch noch keine zytogenetische Abnormalität als konsistent herausgestellt (Willemze et al. 1997). Ansätze einer solchen Herangehensweise zeigten Johnson et al.. Sie konnten bei fünf von 17 Patienten einen abnormalen chromosomalen Klon nachweisen und in sechs weiteren zwölf sporadische, strukturelle DNA Abnormalitäten (Johnson et al. 1985). Scarisbrick et al. zeigten, dass in 37%

der Patienten mit Sézary Syndrom Verlust auf dem Chromosom 9p21 stattfand. Darüber hinaus fanden sie Veränderungen in den Genen P15 und P16 bei 63% der Patienten mit der Diagnose Mycosis fungoides bzw. Sézary Syndrom (Scarisbrick et al. 2002). In anderen Beobachtungen wurde ein Verlust der Heterozygotie auf den Chromosomen 9q(46% der Fälle), 17q(42%), 2q(12%), 10q(12%) und 6q(7%) bei Patienten mit Sézary Syndrom festgestellt (Scarisbrick et al. 2001a).

1.4.3 Immunophänotypisierung und Durchflußzytometrie

1.4.3.1 *Zellsortierverfahren und Flowzytometrie*

Das Ziel von Zellsortierverfahren ist es, aus Zellgemischen bestimmte Zellen für weitere Untersuchungen zu isolieren. Für die Zelltrennung müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Zellen als Einzelzellsuspension vorliegen. Zum anderen werden Unterscheidungsmerkmale für die aufzutrennenden Zellpopulationen benötigt. Eigenschaften, die zur Trennung von Zellen genutzt werden, lassen sich in physikalische (Zellgröße, Zellvolumen, Zelldichte, Lichtstreuung und -absorption), biochemisch-zellbiologische (DNA-Gehalt, Ionenkonzentration, Enzyme) und immunologische (spezifische Oberflächenproteine) Parameter unterteilen. Zu den am häufigsten genutzten Techniken gehören das Filtrieren, die Dichtezentrifugation, die Elektrophorese, die Lyse, die magnetische Zellsortierung und die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung. Das Filtrieren erfolgt über Nylongaze mit genau definierter Maschenweite, z.B. 50µm und wird genutzt, um störende Zellaggregate zu entfernen.

Grundlage der Dichtezentrifugation ist das Stoke'sche Gesetz. Durch Zentrifugation werden Zellen entsprechend ihrer Größe und/ oder Dichte und damit nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt. Der Ficollpaque-Gradient ist ein häufig verwendetes Verfahren zur Separation von Leukozyten (PBMC) von den Erythrozyten. Zu den magnetischen Zellsortierverfahren gehört das *magnetic bead cell sorting*, MACS-Verfahren. Dabei werden superparamagnetische Partikel mit monoklonalen Antikörpern konjugiert. Diese können dann entweder direkt an die Zellen binden oder indirekt über anti-Antikörper-Magnetpartikel die Zellen markieren. Die Zellsuspension wird über eine Stahlwollsäule gegeben, die sich in einem sehr starken Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen bleiben an der Stahlwolle hängen, die unmarkierten passieren das Magnetfeld. Durch Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und Spülen der Säule erhält man die markierten Zellen. Dieses Verfahren eignet sich besonders zum Anreichern und zur Depletion von Zellpopulationen.

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung erfolgt mit Hilfe von Durchflußzytometern. Die Zellsuspension mit Zellen, die durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper gefärbt sind, wird

aus einem Probenröhrchen in das Gerät transportiert. Die Zellen werden dann an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dort wird zum einen der an den Antikörpern befindliche Farbstoff angeregt, zum anderen entsteht aufgrund der Granularität der Zellen ein Streulicht und es wird Licht aufgrund der Größe der Zellen absorbiert. Der Farbstoff emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Auf diese Art entstehen mehrere Signale, durch die die Zelle definiert wird. Mit Hilfe spezieller Software lassen sich die Zellen nach gewünschten Parametern, wie Größe, Granularität oder Oberflächenantigenen, auswerten. Einen Schritt weiter geht die Separation von Zellpopulationen mit Hilfe eines Durchflußzytometers. Hierbei werden mit Hilfe der Steuerungssoftware festgelegte Zellpopulationen nach ihren Eigenschaften sortiert.

1.4.3.2 T-Zell Phänotyp in den verschiedenen Entwicklungsstadien von T-Zellen

Die T-Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Zu Beginn der Entwicklung ist ihr Markermolekül das CD34. Diese Vorläuferzellen entwickeln sich weiter zu Prä-Thymozyten, Marker sind jetzt CD34 und das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotransferase). Bereits hier findet ein Rearrangement der γ -Kette des TCR statt. Nach Einwanderung der Zellen in den Thymus, werden sie frühe Thymozyten genannt, sie sind dann positiv für CD2, CD7 und noch negativ für CD4 und CD8. Es kommt zum Rearrangement der TCR- α und - β . Die Weiterentwicklung zum reifen Thymozyten geht einher mit der Expression von CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 und CD8. Es differenzieren sich zwei Populationen, eine dominierend TCR- $\alpha\beta$ exprimierende und eine TCR- $\gamma\delta$ positive. Im Thymus kommt es zur Positiv-Selektion immunkompetenter Zellen. Nach Abschluss der Reifung lassen sich im Blut bzw. den Lymphknoten drei dominante T-Lymphozyten-Populationen, die positiv für die Pan-T-Zell Marker CD2, CD3, CD5, CD7 sind und den TCR- $\alpha\beta$ exprimieren, nachweisen: CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, CD4⁺ CD45RA⁺ naive T-Zellen und CD4⁺ CD29⁺ CD45RO⁺ Memory-T-Zellen (Ostendorf und Seeber 1997).

Untersuchungen von Ginaldi et al. zeigten, dass der Anteil der CD3⁺CD7⁺ Zellen an den Lymphozyten im Blut Gesunder bei 62,25% liegt. Die Population der CD3⁺CD7⁻ Lymphozyten entsprach einem Anteil von 8,47%. Die CD3⁺CD7⁺CD56⁺ NK (Natürliche Killer-) Zellen haben einen Anteil von 9,95% der Lymphozyten. Die übrigen Anteile entfallen auf CD3⁻ B-Lymphozyten (Ginaldi et al. 1996).

1.4.3.3 Immunophänotyp des Sézary Syndroms

Die besondere Morphologie der Sézary-Zellen im Elektronenmikroskop gab Anlass zur Frage, ob nicht die Oberfläche der Tumorzellen ebenfalls Besonderheiten aufweist. Diesen Fragen widmeten sich schon früh Haynes et al. (Haynes et al. 1981). Diese Untersuchungen und

Versuche anderer Arbeitsgruppen zeigten folgenden Immunphänotyp der Zellen beim Sézary Syndrom: es besteht eine erhöhte CD4/CD8 Ratio, wobei die Zahl der CD8⁺ Zellen nicht erhöht ist. Die Tumorzellen weisen einen T-Helfer-Phänotyp auf, der durch CD2⁺, CD3⁺CD4⁺, CD5⁺, CD8⁻, CD25⁻, CD29⁺ und CD45R0⁺ Zellen gekennzeichnet ist (Bogen et al. 1996, Bernengo et al. 1998, Scala et al. 1999, Bernengo et al. 2001). Sterry et al. beschrieben darüber hinaus die Tumorzellen als CD45RA⁻ T-Helfer Zellen (Sterry und Mielke 1989).

Um die Tumorzellen besser zu charakterisieren, wurden viele Oberflächenantigene von T-Zellen auch auf Sézary-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine bimodale Expression von CD3 und CD4 auf T-Lymphozyten beim Sézary Syndrom möglich ist. Bimodal bedeutet eine geringere Expression von Oberflächenantigenen und damit eine geringere Dichte der Antigene auf der Zelloberfläche. Diese Populationen werden als *dim* und *bright* bezeichnet (Bogen et al. 1996, Scala et al. 1999, Jones et al. 2001). Die verminderte Expression bis hin zum Verlust des Oberflächenmoleküls CD7 ist als Charakteristikum des Sézary Syndroms beschrieben worden (Bogen et al. 1996, Bernengo et al. 1998). Der Verlust von Pan-T-Zellmarkern wie CD2, CD3 und CD5 wird ebenfalls als charakteristisch für Sézary-Zellen beschrieben (Harmon et al. 1996). Der Anteil der CD4⁺CD7⁻ variiert dabei von 5%-95% (Bernengo et al. 1998, Dummer et al. 1999). Andere Autoren beschreiben Sézary-Zellen als überwiegend CD7⁻, wobei auch CD7⁺ Sézary-Zellen vorhanden sein können (Bogen et al. 1996). Mit dem Voranschreiten der Erkrankung nimmt der Anteil der CD7⁻ Zellen zu (Jakob et al. 1996, Laetsch et al. 2000). Dabei kommt es zu einem vermehrten Auftreten von CD7⁻ Zellen, nicht jedoch von CD7⁺ (Vonderheid et al. 2001). Die beschriebene Zunahme der Ratio CD4/CD8 wird durch die Expansion der CD4⁺CD7⁻ Zellen erklärt (Scala et al. 1999). Von Reinhold et al. wurde gezeigt, dass CD7⁻ Zellen im Sézary Syndrom einen zerebriformen Kern haben, im Blut gesunder weisen CD7⁻ Zellen hingegen einen normalen Kern auf (Reinhold et al. 1993). Es ist beschrieben, dass der T-Zell-Klon mit dem Verlust von CD7 assoziiert ist, wobei auch CD7⁺ Klonalität beschrieben wurde. Die Problematik des Klonalitätsnachweises in den CD4⁺CD7⁺ bzw. CD4⁺CD7⁻ T-Zell Populationen ist noch nicht gelöst worden. Die Schwierigkeit liegt in der eindeutigen Identifizierung der Tumorzellen. Rappl et al. gingen davon aus, dass alle T-Zellen, mit identischer V β -Expression in der FACS-Analyse zu ein und dem selben Klon gehören. Sie fanden daraufhin heraus, dass CD3⁺ Zellen mit identischem V β (72-96% der Gesamtpopulation) zu 98% kein CD7 exprimieren (Rappl et al. 2001).

Die Zunahme der CD7⁻ T-Zell Population beim Sézary Syndrom geht einher mit der Expansion von CD15⁺, CD26⁻ und CD45⁻ T-Lymphozyten (Scala et al. 1999, Rappl et al. 2001).

Dieser Verlust des CD26, einem Aktivierungsmarker für T-Lymphozyten, stellt ebenfalls ein

wichtiges Phänomen im Blut von Patienten mit Sézary Syndrom dar. Die CD26 Negativität stellt einen konstanten Marker für Sézary-Zellen dar. Darüber hinaus wurden die Zellen mit zerebriformen Nukleus als CD26⁻ beschrieben (Bernengo et al. 2001). Eine signifikante positive Korrelation mit dem Stadium der Erkrankung konnte gezeigt werden, je höher der Anteil der CD26⁻, desto ausgeprägter war die hämatologische Beteiligung (Novelli et al. 1995). Der Anteil der CD4⁺CD26⁻ Zellen wird im Durchschnitt mit 80% angegeben, wobei ein Anteil von über 30% CD26⁻ schon als sicheres Indiz für ein Sézary Syndrom angesehen werden kann (Bernengo et al. 2001). Rappl et al. zeigten, dass in einem phänotypischen V β -Klon von CD3⁺ Zellen zwischen 96 und 98% der Zellen CD26⁻ sind (Rappl et al. 2001).

Kombinierte Untersuchungen von CD7 und CD26 ergaben, dass Sézary-Zellen CD4⁺CD26⁻CD7⁻ und CD4⁺CD26⁻CD7⁺ sein können (Novelli et al. 1995).

Die Beurteilung der o.g. Daten ist jedoch problematisch, da eine saubere Trennung der CD7⁺/CD7⁻ und CD26⁺/CD26⁻ in der FACS-Analyse nicht möglich ist. Diese Populationen bilden ein s.g. *straight line staining pattern*, was auf einen allmählichen Verlust bzw. kontinuierliche Reduktion der Expression dieser Antigene hinweist (Jakob et al. 1996, Vonderheid et al. 2001). Die Detektion neoplastischer Zellen mit Hilfe der Flowzytometrie ist ebenfalls problematisch, da kein sicherer Klonalitätsnachweis möglich ist (Jones et al. 2001). Aus diesen Gründen eignet sich die alleinige Flowzytometrie nicht für den Tumornachweis, stellt jedoch eine gute Methode für Verlaufs- und Therapiekontrollen dar (Jakob et al. 1996).

1.4.3.4 Das Oberflächenantigen CD7

Das Oberflächenmolekül CD7 ist ein 40kDa schweres, *single-chain-Immunglobulin-superfamily* Molekül auf T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK). CD7 ist ein frühes Antigen in der T-Zell Entwicklung (Sempowski et al. 1999). Die Oberflächendichte des Moleküls ist am Anfang der Entwicklung der T-Zellen am höchsten, in späteren Stadien nimmt die Dichte des Moleküls auf der Zelloberfläche ab (Ginaldi et al. 1996).

Positiv für CD4 und negativ für CD7 zu sein, sind stabile Eigenschaften von zirkulierenden T-Zellen. CD7⁺ und CD7⁻ T-Lymphozyten stellen Subpopulationen von T-Lymphozyten dar und spiegeln einen natürlichen Differenzierungsweg in der Immunantwort wieder (Reinhold et al. 1996). Interessanterweise finden sich im Nabelschnurblut keine CD7⁻ T-Zellen. Jedoch kommt es im Alter zu einem Anstieg von CD7⁻ T-Lymphozyten, sowohl prozentual als auch absolut, so dass diese bis zu 14% der CD3⁺ Zellen ausmachen können (Kukel et al. 1994). Im Blut eines Erwachsenen sind im Durchschnitt 9% \pm 3,4% der Lymphozyten CD3⁺CD7⁻. Die Mehrheit der CD7⁻ Zellen exprimiert, wie die CD7⁺ Zellpopulation auch, einen TCR mit α und β Kette und ist außerdem CD4⁺ (Reinhold et al. 1993). Desweiteren findet sich bei den CD7⁻ Lymphozyten noch folgende Oberflächenantigenkonstellationen: CD3⁺CD4⁺CD45Ro⁺ oder CD45RA⁺ (Kukel et al. 1994). Die erhöhte Expression des Antigens CLA auf den CD7⁻ Zellen

wird dafür verantwortlich gemacht, dass man diese Zellen vermehrt in der Haut findet. Dies zeigt sich schon in gesunder Haut, wesentlich eindeutiger jedoch in chronisch entzündlichen Prozessen der Haut. Dort können sie 15-60% der CD4⁺ Zellen ausmachen (Reinhold et al. 1996, Liu et al. 2000, Rappl et al. 2001).

Die Funktion des CD7 Antigen wird noch diskutiert. Chan et al. zeigten, dass über das CD7 Molekül extrazelluläre Signale zu einer intrazellulären Antwort führen. Eine Antwort stellt die Aktivierung einer Tyrosinkinase dar. Über diese Tyrosinkinase-Aktivität wird die β -Integrin vermittelte Zelladhäsion positiv beeinflusst. Diese Integrin vermittelte Adhäsion konnte nach Stimulierung mit monoklonalen Anti-CD7-Antikörpern gezeigt werden (Chan et al. 1994). Lazarovits et al. äußerten des weiteren die These, dass diese Tyrosinkinase-Aktivierung als frühes Zeichen einer T-Zell Aktivierung anzusehen sei (Lazarovits et al. 1994).

Pace et al. konnten zeigen, dass CD7 für den Galectin-1 induzierten Zelltod nötig ist. Galectin-1 ist ein endogenes Galectin, exprimiert in lymphatischen Organen, welches Apoptose in Thymozyten und T-Zellen induziert. Es bindet an verschiedene T-Zell Oberflächenglykoproteine, u.a. an CD7 (Pace et al. 2000). Dabei scheint vor allem die Bindung des Galectin-1 an das CD7 Molekül in der Induzierung der Apoptose wichtig zu sein. Diese Bindung induziert eine Aktivierung von AP1, einem Apoptose induzierendem Protein und eine Herunterregulierung von bcl-2, einem Apoptosehemmer. Wird das CD7 Molekül nicht mehr exprimiert, geht diese Regulierung verloren. Dies könnte den CD7⁻ neoplastischen Zellen, aufgrund der fehlgesteuerten Apoptose, das Überleben erleichtern (Rappl et al. 2002).

Die Induktion der Produktion von IL-2, TNF- α , TNF- β und GM-CSF durch Stimulation via CD7 konnte von Sempowski et al. gezeigt werden. Sie beschrieben auch, dass die CD7 Expression auf T-Zellen einer undifferenzierten T-Zell Neoplasie (ALL, T-Zell-Lymphoblastisches Lymphom) höher ist als auf T-Zellen von differenzierten T-Zell Neoplasien (Sézary Syndrom, HTLV-1 adult T-Zell Leukämie) (Sempowski et al. 1999).

1.4.3.5 Das Oberflächenantigen CD26

Das Glykoprotein CD26 wird auch als Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV) oder Adenosin Deaminase Bindendes Protein bezeichnet. Es handelt sich um ein 110kDa Glykoprotein, das nur als Dimer katalytisch aktiv ist. Lokalisiert ist der genetische Code auf Chromosom 2q24.2, das Protein hat eine Länge von 766 Aminosäuren. Es wird als spezifisches, multifunktionales Oberflächenantigen auf T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert. CD26 kann auch als Aktivierungsmarker verstanden werden, da es auf ruhenden Zellen kaum und nach Stimulierung fünf bis zehnfach verstärkt exprimiert wird. Die Eigenschaft, die CD2 und CD3 abhängige Aktivierung und Proliferation zu verstärken, kann durch monoklonale Antikörper gegen CD26 gezeigt werden (Gorell et al 2001, Gines et al. 2002).

Alle aktivierten CD3⁺ T-Lymphozyten tragen auf ihrer Zelloberfläche auch CD26. Bei den

CD4⁺CD26⁺ T-Lymphozyten handelt es sich um eine Gedächtnis/ Helfer Subpopulation, die auch CD45Ro⁺ und CD29⁺ ist. Nur CD4⁺CD26⁺ Lymphozyten sind in der Lage, zytotoxische T-Zellen zu aktivieren und die Immunglobulinproduktion in den B-Lymphozyten zu induzieren. Zellen, die ein TH-1-Profil haben, exprimieren mehr CD26 als T-Zellen mit TH-2-Profil. Auch wird das Migrationsverhalten der T-Lymphozyten durch CD26 beeinflusst (Bernengo et al. 2001, Jones et al. 2001).

Als die drei Hauptfunktionen der DPPIV werden die Adenosin Deaminase bindende Aktivität (ADA), die Peptidase Aktivität und das Binden an extrazelluläre Matrix beschrieben. Die Substrate der DPPIV beinhalten verschiedene Chemokine (Gorrell et al. 2001). Beobachtungen der Funktion des CD26 im Zusammenhang mit der ADA kamen zu dem Ergebnis, dass diese Interaktion wichtig ist für die Lymphozyten-Epithel-Adhäsion, aber auch die Interaktion mit extrakutanen Organen (Ginaldi et al. 2002).

In der Durchflußzytometrie zeigen sich im Blut von gesunden Probanden 56%-86% als CD3⁺CD4⁺CD26⁺ T-Lymphozyten. Bei den CD3⁺CD56⁺ NK-Zellen sind nur ca. 10% CD26⁺. Das fehlen bzw. eine *dim*-Expression von CD26 ist als Charakteristikum von Sézary Syndrom und Mycosis fungoides beschrieben worden (Bernengo et al. 2001, Jones et al. 2001).

Der im Blut nachweisbaren, löslichen Variante des CD26 Rezeptors wird eine immunomodulatorische Funktion zugeschrieben (Gorrell et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur CD26⁺ Lymphozyten in der Lage sind INF- γ zu produzieren (Hildebrandt et al. 2000).

Der Zusammenhang von DPPIV Aktivität, CD26 Expression und anderen Krankheiten ist in der Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: CD26 Expression und DPPIV Aktivität bei anderen Erkrankungen

Erkrankung / Zustand	DPPIV Aktivität	CD26 Expression
Allograft Abstoßung	↑ im Serum	↑ auf Lymphozyten
systemischer Lupus erythematodes	↓ im Serum aller Patienten ↓ in Lymphozyten von Patienten mit aktiver Erkrankung	keine Daten
Rheumatoide Arthritis	↓ in der synovial Flüssigkeit	keine Daten
Schwangerschaft	↓ im Serum	keine Daten
AIDS	normal	↓ Zahl von CD26 ⁺ Lymphozyten
Major Depression	↓ im Serum	keine Daten
Schizophrenie	↓ im Serum	keine Daten
Fibromyalgie	normal	keine Daten
Anorexia nervosa	↑ im Serum	↓ Zahl von CD26 ⁺ Lymphozyten

(Hildebrandt et al. 2000)

Die Auswahl der beobachteten Erkrankungen bzw. Gesundheitszustände zeigt den vielseitigen Einfluss der DPPIV bzw. des CD26. In der Tabelle dargestellt sind die Beobachtungen für die lösliche Variante des CD26, die DPPIV auf anderen Geweben und die CD26 Expression auf T-Lymphozyten (Hildebrandt et al. 2000).

1.4.4 Molekularbiologie

Der antigenspezifische Rezeptor, der auf reifen T-Lymphozyten exprimiert wird, heißt T-Zell-Rezeptor (TCR). Er ist nicht-kovalent mit dem CD3 Proteinkomplex assoziiert. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen, über Disulfidbrücken verbundenen Glykoproteinen: einer TCR- α und TCR- β -Kette bzw. einer TCR- γ und TCR- δ -Kette. Über 85% der T-Lymphozyten exprimieren TCR- $\alpha\beta$, nur 2 – 15% TCR- $\gamma\delta$. Jede dieser Ketten wird aus einem variablen und einem konstanten Teil (C) aufgebaut. Die variable Region setzt sich zusammen aus einem variablen (V) Gensegment, einem verbindenden (J) Segment und einer junktionalen Zone, die V und J verbindet. Der konstante Teil der Glykoproteinkette wird durch ein konstantes (C)- Gensegment verschlüsselt. Die TCR- β und die TCR- δ Gene weisen die Besonderheit eines D-Gensegmentes in der junktionalen Zone auf (Dongen et al. 1990, Breit et al. 1992).

Alle humanen Zellen enthalten den genetischen Code für alle vier TCR-Ketten in der Keimbahnkonfiguration. Die Gene für die α - und β - Kette kodieren eine Vielzahl funktioneller V- (α -Kette 57, β -Kette 65) und J-Segmente(55 bzw. 13) (Rowen et al. 1996). Die Gene für die Ketten des TCR- γ und - δ weisen hingegen nur eine geringe Zahl von V-(8 bei der γ -Kette bzw. 6 bei der δ -Kette) und J-Segmenten (5 bzw. 3) auf. Während der T-Zellreifung kommt es zu einem Umlagerungsprozess der TCR-Gene, dem Rearrangement, wobei je ein V-, (ein D-) und ein J-Segment pro Kette unter Bildung eines funktionellen Gens verknüpft werden. Die Mannigfaltigkeit der TCR-Moleküle, durch die jeder T-Lymphozyt eine individuelle DNA-Sequenz erhält, entsteht durch zwei Teilprozesse: 1. durch Bildung zellspezifischer TCR-V-J- bzw. V-D-J-Rearrangements, die so genannte kombinatorische Diversität und 2. durch zusätzliche Veränderungen im Bereich der Verknüpfungsstellen der Segmente (N-Region), die so genannte junktionale Diversität. Damit ergeben sich für den TCR- $\alpha\beta$ rein arithmetisch über 7×10^6 und für den TCR- $\gamma\delta$ über 5×10^3 Kombinationsmöglichkeiten. Aufgrund der junktionalen Diversität existieren jedoch weitaus mehr Kombinationsmöglichkeiten. Das für jeden T-Lymphozyten spezifische Rearrangement wird an Tochterzellen weitergegeben. Entsprechend der Hypothese, dass Neoplasien sich aus einer maligne entarteten Zelle entwickeln, findet man bei T-Zell Lymphomen zahlreiche T-Lymphozyten mit identischen TCR-Sequenzen (monoklonale Zellen). Polyklonale Zellen

weisen dementsprechend ein breites Spektrum an Sequenzen auf (Dongen et al. 1990, Trainor et al. 1991, Volkenandt et al. 1991, Breit et al. 1992, Lukowsky et al. 1998).

Aufgrund dieser genetischen Gegebenheiten ist es möglich, mit Hilfe molekularbiologischer Techniken klonale Zellen im Blut oder Gewebe nachzuweisen. Zu diesen Techniken gehört der Southern Blot und die PCR.

1.4.4.1 Klonalitätsnachweis durch Southern Blot

Seit ca. 20 Jahren werden zunehmend molekularbiologische Methoden eingesetzt um die Klonalität von T-Lymphozyten und damit deren Dignität einzuschätzen. Das Southernblotting war die erste angewandte Methode. Dabei wird DNA aus zu untersuchenden Zellen präpariert und mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die entstandenen DNA-Fragmente werden in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert (blotting) und mit Hilfe von Gensonden sichtbar gemacht. DNA klonal expandierter Zellen stellt sich im Southernblot als diskrete Bande außerhalb der Keimbahnbanden dar.

Im Blut von Patienten mit Sézary Syndrom lässt sich auf diese Weise in bis zu 80% der Fälle ein Klon nachweisen. In Hautproben der Patienten konnte in 70% der Fälle eine Monoklonalität nachgewiesen werden (Whittaker et al. 1991, Zelickson et al. 1991, Fraser-Andrews et al. 2001).

Die Nachteile dieser Methode liegen in dem hohen technischen Aufwand und der erforderlichen großen Menge intakter DNA. In der Literatur wird die untere Nachweisgrenze unter optimalen Bedingungen mit 1% klonale Zellen in den analysierten Zellen angegeben. Tatsächlich ist aber von einer Sensitivität von 2% –5% auszugehen (Wood et al. 1994).

1.4.4.2 Klonalitätsanalyse mittels PCR

Die Nachteile, die mit dem Southernblotting verbunden sind, führten zur Einführung anderer diagnostischer Hilfsmittel in die Routinediagnostik. Zwei Strategien wurden verfolgt. Einerseits werden durch Amplifizierung und anschließender Sequenzierung der TCR-Gene patientenspezifische Primer entwickelt, die dann der Verlaufskontrolle dienen können (Volkenandt et al. 1991). Andererseits hat sich für die Routinediagnostik die Verwendung von Primern durchgesetzt, die alle möglichen Rearrangements der TCR-Gene amplifizieren können. Aufgrund der wenigen V- und J-Gene bietet sich die Amplifizierung des TCR- γ -Gens an. Es wurden eine Reihe von Konsensusprimern für die TCR-V γ und J γ -Segmente entwickelt. Obwohl fast alle CTCL TCR- $\alpha\beta$ exprimieren stellt sich die Amplifizierung der TCR- α und TCR- β aufgrund der großen Zahl und Heterogenität der V und J Gensegmente aus gemischter DNA als schwierig dar. Zur Einschätzung der Klonalität ist eine Auftrennung

der amplifizierten Sequenzen nötig. Diese Analyse der PCR-Produkte erfolgt sowohl in Agarosegelen als auch mit hochauflösenden Techniken wie der TGGE (Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese). Sie trennen die Produkte nach Größe, Ladung und Stabilität gegenüber thermischen Einflüssen auf. Polyklonale Amplifikate ergeben einen „Schmier“ nach der Färbung, klonale Anteile stellen sich als diskrete Bande dar (Muche et al. 1997).

Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich im Blut von Sézary Syndrom Patienten in 90% bis 100% der Fälle eine monoklonale T-Zell Population nachzuweisen (Russel-Jones und Whittaker 1999, Laetsch et al. 2000, Fraser-Andrews et al. 2001). Die Untersuchung von Hautproben ergibt in ca. 75% der Fälle einen Klonalitätsnachweis (Muche et al. 1997, Russel-Jones und Whittaker 1999). Dieser Klonalitätsnachweis ist jedoch rein qualitativ, da mit Hilfe der beschriebenen Methode nur klonale Zellen nachgewiesen werden, aber keine Aussage über deren Anzahl getroffen werden kann.

Seit einiger Zeit wird für die Diagnosestellung eines Sézary Syndrom ein Klonalitätsnachweis im Blut mit Hilfe der PCR gefordert (Weinberg et al. 1995, Willemze et al. 1997, Russel-Jones und Whittaker 1999).

1.4.4.3 Klonalitätsnachweis und Therapie-Monitoring mit Hilfe quantitativer PCR-Analyse

Die Schwäche der qualitativen PCR-Analyse liegt darin, dass die Menge des amplifizierten Gen-Produktes keine Aussage über die zum Beginn der Reaktion vorkommende Ziel-DNA Menge ermöglicht. Abhilfe schafft hier die quantitative PCR mit Echtzeitmessung (*real-time PCR*). Mit deren Hilfe ist es möglich, die pro Amplifikationszyklus entstandene DNA-Menge zu bestimmen und damit Rückschlüsse auf die ursprünglich eingesetzte Menge an Ziel-DNA zu ziehen. Bisher wurde diese Technik vor allem in der HIV-Diagnostik zur Bestimmung der Viruslast, aber auch in der Onkologie um genetische Alterationen zu quantifizieren, genutzt (Rappl et al. 2002). Interessant ist der Einsatz dieser Technik für die Überwachung der Therapie von hämatologischen Tumorerkrankungen. Hierbei ist es möglich, Aussagen über die Tumorlast im Blut zutreffen. So starteten Sarris et al. eine Studie über Patienten mit fortgeschrittenen Non-Hodgkin Lymphomen. Bei diesen sollen vor, während und nach der Therapie t(14;18) Translokationen nachgewiesen werden (Sarris et al. 2002). Darüber hinaus wird die Methode auch angewandt um eventuell noch vorhandene Tumorzellen nach der Therapie nachzuweisen. Dabei handelt es sich um den Nachweis sogenannter minimaler Resterkrankungen (*minimal residual disease*) (Sharp et al. 1999). Die Kombination von Allelspezifischen Primern und einer quantitativen PCR zum Nachweis eines residualen Tumors wurde für die chronisch lymphatische B-Zell-Leukämie etabliert (Pfitzner et al. 2002).

Der LightCycler[®] der Firma Roche bietet die Möglichkeit, eine solche quantitative PCR

durchzuführen. Bei diesem Verfahren wird durch die Analyse eines Fluoreszenzsignals die Bestimmung der entstandenen PCR-Produktmenge nach jedem Zyklus ermöglicht. Gleichzeitig ist eine Bewertung der Kinetik der DNA-Amplifikation möglich. Das Fluoreszenzsignal kann zum einen über einen Farbstoff SYBRGreen I[®], der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, oder über markierter Hybridisierungsproben, welche spezifisch an die Ziel-Sequenz binden, erzeugt werden (Jung et al. 2000, Sarris et al. 2002).

Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem Amplifikationszyklus gemessen. Der Computer errechnet dann die entsprechenden Signalintensitätswerte R für jeden Zyklus n. Die Emissionsintensität ist gewöhnlich dargestellt als ΔR_n . Der *Crossingpoint* C_p stellt eine imaginäre Zykluszahl dar, zu der eine definierte Menge an PCR-Produkt vorliegt. Setzt man die PCR-Produktmenge am *Crossingpoint* als K und die Zykluszahl als Z (mit T_0 gleich der DNA-Ausgangsmenge und E für die Effizienz), ist $K = T_0 \times E^Z$ bzw. linearisiert und umgeformt

$C_p = -\left(\frac{1}{\log E}\right) \times T_0 + \left(\frac{\log K}{\log E}\right)$. Die erhaltene Formel ist die Gleichung für eine Standardkurve. Werden Standardkonzentration und die gesuchte DNA (Ziel-DNA) mit gleicher Effizienz amplifiziert, kann mit Hilfe der *Crossingpoints* der Standardverdünnung und dem *Crossingpoint* der Ziel-DNA die Konzentration der Ziel-DNA berechnet werden (Roche Molecular Biochemicals (a)). Diese Methode ist bei Pfitzner et al. ebenfalls zur Quantifizierung des Residualtumors beschrieben worden (Pfitzner et al. 2002).

1.5 Therapie, Prognose und prognostische Faktoren

1.5.1 Therapie des Sézary Syndroms

Aufgrund der Tatsache, dass es sich beim Sézary Syndrom um eine seltene Krankheit handelt, finden sich keine prospektiv vergleichenden Studien zu Therapieregimen.

Für die Therapieentscheidung ist ein *Staging* mit Festlegung des TNM-Status wichtig. Dieses *Staging* beinhaltet eine Beurteilung der gesamten Haut, ein Röntgen des Thorax, ein Ultraschallbefund vom Abdomen und der Lymphknotenstationen, eventuell ein Computertomogram und eine histopathologische Beurteilung verdächtiger Lymphknoten. Das *Staging* wird wiederholt nach 12 Monaten oder bei Auftreten eines Rezidives. Als Therapieoptionen wurden diverse Medikamente, Chemotherapeutika und physikalische Verfahren vorgeschlagen. Dazu gehören Kortikosteroide, Mechlothamine (Nitrogen Mustard), Carmustine (BCNU), Radiotherapie, Elektronenstrahl-Behandlung, Photochemotherapie (PUVA und extrakorporale Photopherese (ECP)), Retinoide, biologische *Response Modifier* und verschiedene Kombinationen der genannten Optionen (Wieselthier et al. 1990, Muche et al. 2000).

Die ECP ist ein Verfahren, bei dem Leukozyten aus dem Blut isoliert, und extracorporal mit 8-MOP und UVA behandelt werden. Anschließend werden diese reinfundiert. Zu den biologischen Response Modifiern gehört INF- α . Es wirkt über eine Downregulierung der TH-2-Antwort antiproliferativ.

Aus veröffentlichten Daten ist ersichtlich, dass Mechlorthamine, Elektronenstrahl-Bestrahlung (TSEBT) und Retinoide (mit Ausnahme von Arotinoid Ethylester) als alleinige Maßnahmen in der Behandlung von Patienten mit Sézary Syndrom nicht effektiv sind (Wieselthier et al. 1990).

Heute wird eine, dem TNM-Stadium angepasste Therapie empfohlen. Dabei werden einzelne Komponenten kombiniert um Synergieeffekte auszunutzen, die Langzeit-Toxizität zu reduzieren und die Zeit bis zum Rezidiv zu verlängern. Eine Therapie könnte sich wie folgt darstellen: Initial führt man eine Extracorporale Photopherese durch und behandelt mit INF- α . Alternativ zu der Extracorporalen Photopherese kann Chlorambucil und Prednison gegeben werden. Eine Rezidivbehandlung besteht aus Chlorambucil/ Prednison oder TSEBT. Die Erhaltungstherapie setzt sich aus INF- α oder Chlorambucil und Prednison zusammen (Muche et al. 1999).

Das Therapiemonitoring erfolgt überwiegend durch klinische Examination. Zu den bisher vorgeschlagenen paraklinischen Kriterien zählen die Sézary-Zellzahl, die CD4/CD8 Ratio und der Anteil der CD7⁺ T-Lymphozyten.

Zukünftige Therapieoptionen beinhalten das Nutzen von Fusionsproteinen wie z.B. DAB389IL2 und den Versuch einer Tumorantigen spezifischen Vakzination.

1.5.2 Prognose und prognostische Faktoren

Das Sézary Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die in Bezug auf Diagnose, Klassifizierung und Behandlung Erfahrung erfordert.

Die Prognose der Krankheit wird als schlecht eingeschätzt, jedoch variieren die Angaben der einzelnen Autoren. In der EORTC-Klassifikation wird die Fünf-Jahres-Überlebensrate mit 11% angegeben (Willemze et al. 1997). Wieselthier et al. geben für Patienten mit Sézary Syndrom eine mittlere Überlebenszeit von zweieinhalb bis fünf Jahren an. Dabei haben Patienten mit extrakutaner Organbeteiligung eine noch schlechtere Prognose (Wieselthier et al. 1990) Bernengo et al. beschreiben eine mittlere Überlebenszeit von 31 Monaten, mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 33,5% (Bernengo et al. 1998). Ähnliche Daten werden von Fink-Puches et al. in einer Publikation vom Februar 2002 beschrieben (mittlere Überlebenszeit 39,6 Monate, Fünf-Jahres-Überlebensrate 33%) (Fink-Puches et al. 2002).

Zur Einschätzung der Prognose ist klinisch eine Vorerkrankung an Mycosis fungoides, eine

Leukozytose und eine Lymphknotenbeteiligung relevant. Von den Laborparametern stellte sich eine erhöhte Serum LDH als relevant heraus. Eine hohe Sézary-Zellzahl, das Vorhandensein von großen zirkulierenden Sézary-Zellen und PAS-positive zytoplasmatische Einschlüsse in den Sézary-Zellen erwiesen sich als ungünstige prognostische Faktoren. In der Immunophänotypisierung zeigte sich, dass eine hohe $CD4^+$ Zellzahl, eine hohe $CD4^+/CD8^+$ Ratio und ein $CD7^-$ Sézary-Zellphänotyp ungünstig für die Prognose erscheinen. Bedeutend ist, dass Patienten die keines bzw. nur eines der genannten Kriterien erfüllen, eine gute Prognose haben. Hingegen zeigen Patienten, die zwei oder mehr Kriterien erfüllen, einen aggressiven Krankheitsverlauf und eine schlechte Prognose (Bernengo et al. 1998). Molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass das Vorhandensein eines Tumorzellklons im Blut in Kombination mit einer hohen Sézary-Zellzahl einen schlechten Einfluss auf die Prognose hat (Scarisbrick et al. 2001). Bei Patienten mit Sézary Syndrom sind über 40% der $CD4^+$ Zellen auch $CD26^-$. Der Anteil der $CD4^+CD26^-$ erhöht sich mit steigender Blutbeteiligung. Die Frage ob dieses Phänomen einen Einfluss auf die Prognose hat, muss noch geklärt werden (Bernengo et al. 2001).

2 Problemstellung

Das Sézary Syndrom zeigt unter den CTCL die Besonderheit einer leukämischen Aussaat von malignen Zellen. Die sichere Identifizierung dieser malignen Zellen ist anhand genotypischer und phänotypischer Merkmale beschrieben. Dazu werden durchflußzytometrische und molekularbiologische Methoden eingesetzt. Dennoch existieren in der Fachliteratur widersprüchlichen Angaben zur Definition der Tumorzellen. Ungeachtet dessen, wird der Nachweis atypischer Zellen im Blut, unter Berücksichtigung der Klinik, als Ansatz zur Beurteilung des Therapieerfolges und der Prognose der Patienten angesehen.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Nachweismethode der malignen Zellen. Neben der durchflußzytometrischen Analyse der PBMC ist die Beschreibung des Immunphänotyps der klonalen Zellen von besonderer Bedeutung.

Eine Untersuchung des Zusammenhangs der gefundenen Ergebnisse zu Klinik und Prognose der Patienten ist durchzuführen.

Dazu sollen im Einzelnen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Es soll eine Darstellung der CD7 und CD26 Expression auf CD3⁺ PBMC von an Sézary Syndrom erkrankten Patienten erfolgen und die einzelnen Zellpopulationen im Verlauf der Erkrankung beobachtet werden. Als Vergleich sind PBMC gesunder Probanden heranzuziehen.
2. Die Identifizierung der malignen Zellen soll auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt werden und eine spezifische Methode zum Nachweis der klonalen Zellen etabliert werden.
3. Weiterhin soll eine Methode zur Quantifizierung klonaler Zellen erarbeitet werden. Wie sich die klonalen Zellen auf die CD7^{+/} bzw. CD26^{+/} Populationen verteilen, ist dabei von besonderem Interesse. Ob sich die Verteilung im Verlauf der Erkrankung verändert, ist ebenfalls zu untersuchen.
4. Die Ergebnisse zur Charakterisierung der PBMC und insbesondere der klonalen Zellen sind in Beziehung zu klinischen Daten und der Prognose der Patienten zu setzen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, groß, Megafuge 1,0	Heraeus, Berlin
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Agarosegelkammern	Micro Bio Tec Brand, Gießen
UV-Lampe und Fotodokumentation	Cybertech, Berlin
TGGE Maxi System	Biometra, Göttingen
Inkubator für Klonierung	
Thermoblock	Stuart Scientific, Großbritannien
LightCycler [®]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ABI Prism 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Hilden
FACS Vantage SE	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Calibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

3.1.2 Chemikalien

PBS	1,7mM NaCl; 0,064mM KCl; 0,375% Tris-Base; 0,002% Phenolrot; pH 7,4
TBE	89mM Tris-Base; 89mM Borsäure; 2mM EDTA; pH 8,0
Agarose	UltraPure [®] , Life Technologies, Paisley, Scotland
Agarosegel	2% Agarose in 1x TBE-Puffer
Extraktionspuffer	50mM KCl; 10mM Tris/HCl; 0,45% nonidet-P40; 0,45% Tween20; pH 8,3
Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylenyanol; 15% Ficoll
Ethidiumbromid	
AmpliTaq DNA Polymerase	N808-0153, Roche, Branchburg, NJ, USA
AmpliTaq Gold	4311806, Roche, Branchburg, NJ, USA
10x PCR-Puffer	Applied Biosystems, AmpliTaq DNA Polymerase with Gene Amp, Cat.No. N808-0153, Foster City, CA, USA
MgCl ₂	
DTNP	

100bp DNA Ladder	Cat.No. 15628-019, Invitrogen
BSA (bovine serum albumine)	
BSA-Lösung 100ml PBS + 10g BSA	
FACS-Puffer	96ml PBS, 400µl EDTA, 4ml BSA-Lösung
QIAquick PCR Purification Kit,	Cat. No. 28104, Qiagen Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit,	Cat. No. 28704, Qiagen, Hilden
ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Part No. 4303152, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Media™ AmpBlue	Invitrogen
TOPOTA Clononing Kit	Invitrogen
Filter	Cat.No. 352340, Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

Antikörper:

CD3-PE	Clone SK7	Cat.No. 345764, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD3-FITC	Clone SK7	Cat.No. 345765, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD7-FITC	Clone M-T701	Cat.No. 555360, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CD26-PE	Clone M-A261	Cat.No. 555437, BD Biosciences, San Jose, CA, USA

3.2 Patienten/ Proben

Untersucht wurden Blutproben von Patienten mit Sézary Syndrom der dermatologischen Klinik der Charité Berlin. Die Diagnose des Sézary Syndroms wurde in der Sprechstunde für kutane Lymphome der Klinik entsprechend den EORTC-Kriterien gestellt. Die Entnahme der Blutproben erfolgte vor und während der Therapie. Darüber hinaus wurde im Blut die Zahl der Leukozyten, der CD3 positiven, CD4 positiven, CD8 positiven Zellen und die LDH bestimmt. Desweiteren wurde ein klinischer körperlicher Status erhoben und die Therapie protokolliert. Für die mitgeführten Kontrollen wurde das Blut freiwilliger, gesunder Probanden genutzt. Die Bezeichnung der Proben wird aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tab. 4: Auflistung der Patientenproben

Patient	Datum der Probe	Bezeichnung
DK	15.11.00	DK1
DK	20.11.01	DK2
DK	14.01.02	DK3a
DK	15.01.02	DK3b
FN	29.03.99	FN1
FN	07.03.01	FN2
FN	15.01.02	FN3
FN	26.03.02	FN4
OS	04.08.00	OS1
OS	01.11.00	OS2
RM	22.11.99	RM1
RM	05.05.00	RM2
RM	27.09.00	RM3
SH	29.12.98	SH1
SH	11.02.99	SH2

3.3 Präparation und Lagerung der PBMC

3.3.1 Gewinnung der PBMC

Die untersuchten mononukleären Zellen stammten aus Leukapheresen, die in der Hautklinik der Charité stattfanden bzw. aus Blutproben, die den Sézary Syndrom Patienten in der Poliklinik abgenommen wurden. Zur Gewinnung der PBMC aus dem Vollblut, wurden 20ml einer heparinisierten Probe mit PBS 1:1 verdünnt und über einem Ficollgradienten 20 min bei 2400U/min zentrifugiert. Die PBMC wurden mittels einer Pipette entnommen und anschließend zweimal gewaschen. Dazu nahm man sie in PBS auf, zentrifugierte 10min bei 1800U/min und verwarf den Überstand.

3.3.2 Lagerung der PBMC

Die gewonnenen PBMC, die nicht der DNA-Gewinnung zugeführt wurden, sind zu 5×10^6 Zellen aliquotiert und in 10% DMSO + PBS aufgenommen worden. Danach wurden sie in einem Gefäß mit Propanol langsam bis auf -70 bzw. -130°C in einem Gefrierschrank abgekühlt und eingefroren.

Die für die Untersuchung benötigten Zellen wurden dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut. Das Auftauen geschah in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C für die Zeit von 2min. Anschließend wurden die Zellen sofort in PBS bzw. FACS-Puffer

aufgenommen und zweimal gewaschen, d.h. zentrifugiert mit 1100U/min für 10min und nach Verwerfen des Überstands wieder in Puffer aufgenommen. Vor der Zellfärbung wurden die Zellen mit Hilfe eines Filters mit einer Netzgröße von 70µm von Zelltrümmern und Zellkonglomeraten befreit.

3.3.3 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Einstellen der Proben auf eine bestimmte Menge an Zellen pro Volumeneinheit, wurde zu 10µl der zu bestimmenden Zellsuspension 80µl PBS und 10µl Trypanblau dazugegeben. Die Zugabe von Trypanblau diente dem Ausschluss toter Zellen. Der Ansatz wurde einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10µl dieses Ansatzes auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in den einzelnen Quadranten bestimmt, der Wert mit der größten Abweichung verworfen und der Mittelwert (m) aus den Zählergebnissen gebildet. Mit Hilfe der Formel, die die Verdünnung der Zellsuspension (Faktor 10) und den Kammerfaktor (Faktor 10⁴) berücksichtigt erhielt man die Zellzahl pro ml Zellsuspension (z).

$$z = m \times 10 \times 10^4$$

Anschließend konnte unter Zugabe von PBS die gewünschte Zellzahl pro Volumeneinheit hergestellt werden (x-Vielfache von einer Million Zellen/ml).

3.4 Zellfärbung, FACS und Zellsortierung

3.4.1 Zellfärbung

Für die Immunofluoreszenzanalyse und die Zellsortierung wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert. Zur Charakterisierung der Zellen wurden zwei, gegen verschiedene T-Zell Epitope gerichtete, Antikörper verwendet. Die Antikörper waren Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE) markiert. Da diese Farbstoffe überlappende Absorptionsspektren durch einen Argonlaser bei 488nm Wellenlänge zeigen, jedoch unterschiedliche Emissionsmaxima, können sie gleichzeitig zur Markierung von Zellen eingesetzt werden.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Zellzahl von 1x10⁶ Zellen, bei mehr verfügbaren Zellen wurden die Volumina entsprechend angepasst. Zu Beginn wurde das Volumen auf 60µl Zellsuspension eingestellt und jeweils 20µl der benötigten Antikörperlösungen hinzugegeben. Die folgende Inkubation dauerte 20min bei 4°C, danach wurde der Ansatz bei 2000U/min für 7min zentrifugiert. Das zurückgebliebene Pellet mit den zu untersuchenden Zellen wurde in ca. 500-1000µl FACS-Puffer aufgenommen. Es folgte eine erneute Zentrifugation und Resuspension in FACS-Puffer. Anschließend wurden die

gefärbten Zellen der Analyse zugeführt. Die verwendeten Antikörperkombinationen sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Kombination der Antikörper für die Zellanalyse

	1.Antikörper	2.Antikörper
1.)	CD3-FITC	CD26-PE
2.)	CD3-PE	CD7-FITC
3.)	CD7-FITC	CD26PE

3.4.2 Fluoreszenzmessung am Durchflußzytometer

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit einem Durchflußzytometer analysiert und sortiert. Um eine konstante Qualität der Messergebnisse zu sichern, wurden dieselben Geräteeinstellungen und gespeicherten Softwareparameter verwendet, die während der Vorversuche auf die Antikörpermarkierungen abgestimmt worden waren.

Die Zellpopulationen ließen sich aufgrund ihrer Größe, Granulation und Färbeverhalten unterscheiden. Von den Streueigenschaften der Zelle wurde das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*-FSC), das ein Maß für die Größe der Zellen darstellt, und das 90°-Streulicht (*side scatter*-SSC), ein Maß für die Granularität, gemessen. Allein mit diesen Parametern war bereits eine Unterscheidung von Lymphozyten, Monozyten und Zelltrümmern in einer Probe von PBMC möglich.

Avitale Zellen nehmen unspezifisch Antikörper in das durch die Membranschranke normalerweise unzugängliche Zytoplasma auf. Um diese avitalen Zellpopulationen darzustellen und von der Analyse auszuschließen, wurde eine Färbung der Zellen mit Propidiumjodid durchgeführt.

Die Signale der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle wurden gespeichert, die Daten anschließend mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest[®] ausgewertet und in einem Punktdiagramm (DotPlot) dargestellt. Bei der Auswertung wurde zunächst die interessierende Population der Lymphozyten mit Hilfe der Parameterkombination Vorwärtstreulicht für die Größe und Seitwärtstreulicht für die Granularität eingegrenzt. Diesen Vorgang des Eingrenzens nennt man *gaten*, das Fenster heißt *Gate*. Die Zellen dieses Lymphozytengates wurden dann auf die Aufnahme von Propidiumjodid untersucht (Darstellung der avitalen Zellen) und nur die vitalen Zellen erneut gegatet. Durch dieses elektronische Gaten konnten die vitalen Lymphozyten phänotypisiert werden.

3.4.3 Zellsortierung mittels *CellSorter*

Die Zellsortierung erfolgte an dem System FACSVantage® der Firma Beckton-Dickison. Dieser *CellSorter* ist ein Durchflußzytometer, der neben dem Zählen und Phänotypisieren einzelner Zellpopulationen eine gleichzeitige Trennung der Zellen ermöglicht. Hierzu wurden mit Hilfe der Software für den *CellSorter* die gewünschten Gates für die zu trennenden Zellpopulationen festgelegt.

Die Geschwindigkeit der Sortierung wurde auf 2000 Zellen/sec festgelegt. Die Abbruchrate wurde auf weniger als 10 Zellen/ 2000 sortierte Zellen festgelegt. Die Abbruchrate gibt an, wie viele Zellen pro 2000 sortierter Zellen aufgrund von Ungenauigkeiten verworfen wurden. Es konnten gleichzeitig zwei verschiedene Zellpopulationen präpariert werden.

Eingesetzt wurden die beschriebenen mit PE- und FITC-Antikörpern markierten Zellen. Die Zellen wurden in CD3⁺CD7⁺ und CD3⁺CD7⁻ bzw. in CD3⁺CD26⁺ und CD3⁺CD26⁻ Zellpopulationen aufgetrennt. Auch hier wurde eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid zum Ausschluss avitaler Zellen durchgeführt.

3.5 DNA-Extraktion/ Konsensus PCR/ TCR-β-PCR/ Agarosegelelektrophorese/ TGGE

3.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe eines Proteinase K Aufschlusses und einem DNA-Extraktion-Kit (Roche-Kit für DNA-Extraktion).

Für die Extraktion mit Hilfe eines Proteinase K Aufschlusses wurden zu der gewonnen Zellsuspension 200µl Extraktionspuffer und 20µl Proteinase K hinzugegeben und anschließend bei 55°C mindestens 4h inkubiert. Anschließend erhitzte man die Probe für 15min auf 95°C, wobei die Proteinase K thermisch inaktiviert wurde und zentrifugierte 10min bei 13000U/min. Der Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Die Extraktion der DNA der sortierten Zellen mit dem Roche-Kit war für die Weiterverwendung im LightCycler® nötig. Die Gewinnung der DNA erfolgte wie im Protokoll zu diesem Kit beschrieben. Abweichend wurde im letzten Schritt die DNA in 50µl aufgenommen um eine höhere DNA Konzentration zu erreichen.

3.5.2 TCR-γ-PCR

Bei der TCR-γ-PCR kamen die Primer V_γcons und J_γcons (Volkenandt et al. 1991) zum Einsatz. Die Sequenz der Primer ist in der Tabelle 6 dargestellt.

Diese Primer amplifizieren die Rearrangements der TCR-V_γI (V_γ1-8)- mit TCR-J_γ1/2-

Gensegmente, die in 70% der Fälle von kutanen Lymphomen rearrangieren (Breit et al. 1992).

Der Reaktionsansatz zu 50µl enthielt 5µl 10xPCR Puffer, 4mM MgCl₂, 70µM je dNTP, je 1µM Primer, 1,75µM TaqPolymerase und 5µl der extrahierten DNA der zu untersuchenden Proben. Nach dem Fertigstellen des Ansatzes, durchliefen die Proben das Programm 1 im Thermocycler (s. Tabelle 7)

3.5.3 TCR-β-PCR

Die Durchführung der TCR-β-PCR erfolgte im Reaktionsansatz von 50µl. Dieser enthielt 10xPCR-Puffer, MgCl₂ entsprechend den verwendeten Primern, dargestellt in Tabelle 7, dNTP, TaqPolymerase und 5µl zu untersuchende DNA. Die Primer wurden zu 1µM in folgender Kombination dazugegeben:

Vβ-Primer + JβI-1 + JβII-1

Vβ-Primer + JβI-2 + JβII-2,

nähere Angaben zu den Primern sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die notwendigen Programme richteten sich nach den geforderten Bedingungen der einzelnen Vβ-Primer (dargestellt in Tabelle 7).

Tab. 6: verwendete Primer

Name des Primers	Sequenz
Vγcons (1)	5'CTACATCCACTGGTACCT
Jγcons (1)	5'CAACAAGTGTTGTTCCAC
Vg18 (2)	5'ggTCATCWgCTgWAATCAC
Vβ5 (3)	5'CTGATCAAAACGAGAGGACAGCA
Vβ16 (3)	5'TgTgACCCAATTTCTggACATgATAAT
Vβ17 (3)	5'GAACAGAATTTGAACCACGATGCC
JβI-1 (3)	5'CTCGGATCC(T/A)GAG(C/T)CI(G/A)GT(C/T)CCIIICCAAA
JβII-1 (3)	5'CTCGGATCCT(G/C)AGCC(T/G)IGTGCCIG(G/C)ICCGAA
JβI-2 (3)	5'CTCGGATCCACIG(T/A)GAG(C/T)CI(G/A)GT(C/T)CC
JβII-2 (3)	5'CTCGGATCCACIGT(G/C)AGCC(T/G)IGTGCC

(1) Volkenandt et al. 1991, (2) Muche 1995, (3) Moss et al. 1997

3.5.4 PCR-Programme

Die für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: verwendete PCR-Programme

Nummer	Ansatz			PCR-Programm			
	V-Primer	J- bzw. N-Primer	[MgCl ₂] (in mM)	Annealing-temperatur (in °C)	Zyklenzahl	Hotstart	Produktgröße (bp)
1	Vgcons	Jgcons	4	55	40	nein	260
2	Vb5	jeweils	2,5	58	40	nein	295
3	Vb16	JI/II-1 bzw.	2,5	62	40	nein	263
4	Vb17	JI/II-2	2,5	62	40	nein	257
5	Vg18	Jgcons	2,5	55	40	nein	260
6	Vb16	HeiB1	4	66	35	ja	239
7	Vg18	Kant1	4	60	35	ja	262
8	Vb17	MurB1	4	68	35	ja	210
9	Vb17	Neb3	2,5	66	30	ja	241
10	Vb5	SelbB1	2,5	66	30	ja	262

Hotstart: anstelle der AmpliTaq wurde die AmpliTaq-Gold verwendet

Diese Programme sind für eine PCR im Thermocycler entwickelt worden.

3.5.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Überprüfung der PCR wurde ein 2%iges Agarosegel mit 0,01% Ethidiumbromid hergestellt. Es wurden 8µl des PCR-Produkts nach Zusatz von 2µl Ladepuffer aufgetragen. Zur Kontrolle der Größe der Amplifikate wurde mit jeder Elektrophorese ein Marker (100bp Ladder, In Vitrogen) mitgeführt. Die Gele wurden in 1x TBE-Puffer bei 60V eine Stunde aufgetrennt und bei UV-Durchleuchtung dokumentiert.

3.5.6 Temperaturgradientengelelektrophorese (HD-TGGE-PAGE)

Zur Gewinnung der Heteroduplexe wurden 5µl Amplifikat mit 0,5µl Ladepuffer auf 95°C für 3min denaturiert und anschließend über 10min auf 55°C abgekühlt und 20min inkubiert. Die so gewonnenen Heteroduplexe wurden zu 7µl je Probe auf einem 1 mm dicken Polyacrylamidgel entsprechend dem Protokoll mit einem Temperaturgradienten von 20°C bis 55°C bei 300V-350V und 2h 40 min Laufzeit unter Nutzung des Diagen HD-TGGE-Systems® (Diagen, Hilden, Germany) aufgetrennt. Die Gele wurden einer Silberfärbung entsprechend dem Protokoll Qiagen Silver Staining Protocol für TGGE-Gele zugeführt, fotografiert und in Folie eingeschweißt und aufbewahrt.

3.6 PCR-Produktaufreinigung/ Re-PCR/ Klonierung/ Sequenzierung/ klonspezifische Primer

3.6.1 PCR-Produktaufreinigung

PCR-Produkte enthalten überschüssige dNTPs, Primer und Primerdimere, die vor einer weiteren Verwendung entfernt werden müssen. Um das spezifische PCR-Produkt zu gewinnen, wurde nach der HD-TGGE die Bande gesuchter Größe aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 2ml Eppendorfgefäß mit 1x PCR-Puffer ca.8h geschüttelt. Auf diese Weise wurde die ausgeschnittene DNA aus dem Gel herausgelöst und konnte reamplifiziert werden.(s.u.)

Für die Herstellung Patienten-spezifischer Standardverdünnungen waren ebenfalls aufgereinigte PCR-Produkte nötig. Hierzu wurden die Proben in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Anzahl der Basenpaare der gesuchten DNA war bekannt. Die DNA stellte sich im Agarosegel als Bande dar. Die Bande gesuchter Größe wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur DNA Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit[®] behandelt. Zur Kontrolle, wurde anschließend ein Aliquot des gewonnen Produkts nochmals im Agarosegel begutachtet.

Zur Vorbereitung des PCR-Produktes für die Sequenzierung sind die entsprechenden Proben mit dem QIAquick PCR Purification Kit analog dem Protokoll aufgereinigt worden.

3.6.2 Re-PCR

Um die DNA aus den PCR-Produkten sequenzieren zu können, wurde wie schon beschrieben eine HD-TGGE durchgeführt und das gesuchte Produkt wie in 3.6.1 beschrieben gewonnen. Die Konzentration des PCR-Produktes musste mit Hilfe einer erneuten PCR (s.g. Re-PCR) erhöht werden. Dabei ist das Produkt wie eine DNA-Probe mit dem entsprechenden PCR-Protokoll behandelt worden. Nach der schon beschriebenen Aufreinigung ist anhand der Agarosegelelektrophorese festgelegt worden, wieviel DNA der Sequenzierung zugeführt wurde.

3.6.3 Klonierung

In Vorbereitung der Klonierung wurden die Bakterienkulturplatten mit Hilfe des Media Amp Blue Kit[®] hergestellt. Die Klonierung erfolgte analog der Vorgabe des TOPO-TA Cloning Kit[®]. Die Bakterienkolonien, die die gesuchte DNA in ihr Plasmid einbauten, stellten sich auf den Gel-Platten als blaue Kolonien dar. Um diese DNA sequenzieren zu können, war ein Einsatz dieser DNA in einer PCR nötig. Hierzu wurde ein entsprechender PCR-Ansatz vorbereitet, bei dem nur noch die DNA fehlte. Die betreffenden Kolonien wurden einzeln von

der Platte gewonnen und sofort in den PCR-Ansatz eingebracht. Die DNA wurde amplifiziert und sequenziert.

3.6.4 Sequenzierung

Zur Gewinnung von Einzelstrang DNA kamen 5-10ng DNA in einer Sequenzier-PCR zum Einsatz. Diese wurde mit dem ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit[®] entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit enthielt, zusätzlich zu den dNTP einer einfachen PCR, Didesoxytrinukleotide, die mit vier verschiedenen Farbstoffen, entsprechend der Basen, markiert waren.

Die Sequenzierung, eine so genannte Zyklussequenzierung, wurde auf dem ABI Prism 310[®] (Automatischer DNA Sequenzierer), einem Kapillar-Sequenziergerät durchgeführt. Dieses Gerät erkannte mit Hilfe eines Lasers die markierten Sequenzen und ordnete jeder Länge eine Base zu. Entsprechend der Häufigkeit der Sequenz konnte am Ende der Analyse aus dem sich ergebenden Bild auf die Originalsequenz gefolgert werden.

Mittels Vergleichs der gewonnenen Sequenzen der TCR- γ - und TCR- β -Gene mit aus der EMBO- und NCBI-Datenbank entnommenen einzelnen TCR-Gensequenzen wurden die patientenspezifischen N-Sequenzen bestimmt (Forster et al. 1987, Lefranc et al. 1989, NCBI-Database).

3.6.5 klonspezifische Primer

Um einen T-Zell-Klon eindeutig zu identifizieren, ist eine Sequenzierung eines rearrangierten TCR-Gens unumgänglich. Mit einer Sequenzierung erhält man einen molekularen Fingerabdruck des T-Zell-Klon (Lessin et al. 1991). Um die Sequenz von einem polyklonalen Hintergrund identifizieren zu können, ist in einigen Fällen eine Klonierung der Sequenzen erforderlich (Kneba et al. 1994). Der entscheidende, eine T-Zelle identifizierende Abschnitt einer Sequenz eines T-Zell-Rezeptors ist die so genannte N-Region. Diese entsteht durch zufällig eingefügte Nukleotide in der Verbindungsregion von V- und J-Gensegment während des Rearrangements des TCR. Die Entwicklung von Primern, die spezifisch diese N-Region erkennen, führt zu einer eindeutigen Identifizierung der klonal expandierten Zellen. Darüber hinaus wird eine hohe Spezifität erreicht, da nur DNA der klonalen Zellen amplifiziert wird. Gleichzeitig wird die Sensitivität der PCR durch klonspezifische Primer gesteigert (Volkenandt et al. 1991, Kneba et al. 1994, Mielke et al. 1994).

Mit Hilfe der gewonnenen Sequenzen der TCR- γ - und TCR- β -Gene und der entsprechenden N-Region wurden patientenspezifischen Primer entwickelt. Die Herstellung der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms OLIGO[®] 5.0 *Primer Analysis Software for Windows*[®], National Biosciences, Inc., USA. Der Primer wurde so entworfen, dass das 5'-Ende des

Primers über der klonalen Sequenz der Patienten-DNA lag. Die für die einzelnen Analysen notwendigen Parameter wurden gemäss den in der OLIGO[®]-Software 5.0 für eine hochstringente Primersuche festgelegten Parameter gewählt:

- 3'Dimere: statthaft, wenn $dG > -3,5\text{kcal/mol}$
weitere Dimere: statthaft, wenn $dG > -7,5\text{kcal/mol}$ und Duplexlänge < 4 Nukleotide
Haarnadelstruktur statthaft, wenn $dG > 0\text{kcal/mol}$
Priming Efficiency falsche Bindungsstellen nicht berücksichtigt, wenn *Priming Efficiency* < 160
interne Stabilität maximaler Wert für dG im 3'Bereich = $7,7\text{ kcal/mol}$.

Des weiteren wurde die Schmelztemperatur der einzelnen Oligonukleotiden, analog den Verfahren nach Breslauer ($2(A+T)^\circ + 4(G+C)^\circ$) (Breslauer et al. 1986) und Wetmur *Nearest-Neighbor-Method* (Wetmur et al. 1991), berechnet und verglichen. Als maximale Differenz der Schmelztemperaturen wurden 10°C festgelegt. Bei Unterschieden der mit den beiden Verfahren berechneten Differenzen wurde für die Bewertung das Ergebnis nach der *Nearest-Neighbor-Method* zugrunde gelegt.

3.7 quantitative PCR

Das Verfahren der quantitativen PCR dient zur Bestimmung der Menge einer Ziel-DNA aus einer Probe mit DNA. Dazu wurde hier das System LightCycler[®] der Firma Roche verwendet. Ein externer Standard wurde als Bezugsgröße zur Quantifizierung der Ergebnisse eingesetzt.

3.7.1 Herstellung eines klonspezifischen Standards

Der klonspezifische Standard wurde aus dem PCR-Produkt einer diagnostischen Blutprobe eines jeden Patienten gewonnen. Hierzu wurden $5\mu\text{l}$ DNA einer Blutprobe in einer klonspezifischen PCR eingesetzt und das PCR-Produkt in einem Agarosegel aufgetrennt. Die monoklonale Bande wurde extrahiert und mittels des s.g. *High Pure PCR Product Purification Kit*[®] aufgereinigt. Anschließend wurde die Lichtabsorption bei 260 und 280nm gemessen. Die Messung bei 260nm ergab einen Wert für die DNA-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$, die Messung bei 280nm für die vorhandene Proteinkonzentration. Das Verhältnis der Werte von 260nm zu den Werten bei 280nm lässt Rückschlüsse auf die Reinheit des PCR-Produktes zu und soll über dem Wert 1,8 liegen. Für die Standardverdünnung wurde die Konzentration in Kopien/ μl benötigt. Sie wurde mit Hilfe der folgenden Formeln berechnet:

$$MW = P \times 660 \text{ g / mol}$$

$$S[\text{Kopien} / \mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^{23} [\text{Kopien} / \text{mol}] \times \text{DNA}[\text{g} / \mu\text{l}]}{MW[\text{g} / \text{mol}]}$$

Legende: MW = Molekulargewicht des PCR-Produktes
P = PCR-Produktlänge in Anzahl der Basenpaare
S = Standardkonzentration
DNA = im Spektrometer gemessene DNA-Konzentration
660g/mol = Durchschnittliche Mol-Gewicht der Basen

Die Standardlösungen wurden anschließend auf eine Konzentration von 5×10^6 Kopien/ μl eingestellt.

3.7.2 Die quantitative PCR im LightCycler®

Zu Beginn wurde nach Protokoll ein Reaktionsansatz mit LightCycler® DNA Master SYBRGreen I®, Aqua bident, Mg_2Cl und den Primern hergestellt. Das LightCycler® DNA Master SYBRGreen I® ist ein Gemisch, das die benötigten Bestandteile, dNTP, Taq-Polymerase und das SYBRGreen I®, für die PCR enthält. PCR-Bedingungen und MgCl_2 -Konzentration sind in der Tabelle 16 aufgeführt. Bei jeder Reaktion wurde die DNA von 5×10^3 Zellen eingesetzt und Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Methode des Second-Derivate-Maximum. Bei dieser Methode wird zur Bestimmung der *Crossingpoints* das Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve genutzt.

Der externe Standard bestand aus fünf Verdünnungsstufen einer Verdünnungsreihe von jeweils 10^2 bis 10^6 . Die Schmelztemperatur der entstandenen PCR Produkte wurde mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgewertet. Dieser liegt eine Bewertung der Fluoreszenzintensität in bezug zur Temperatur zugrunde. Mit steigender Temperatur sinkt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund abnehmender Doppelstrang-DNA. Überschreitet die Temperatur die Schmelztemperatur der PCR-Produkte, so kommt es zu einem starken Abfall der Intensität. Damit ergibt sich aus der negativen ersten Ableitung der Schmelzkurve bei T_M ein Maximum. Diese Maxima sind abhängig von der Sequenz der PCR-Produkte. Damit können gewünschte von ungewünschten PCR-Produkten, wie z.B. Primer-Dimere, unterschieden werden.

Für die Analyse der Daten wurden die Parameter gemäss der LightCycler[®]-Software „für eine akkurate Analyse mit externem Standard“ wie folgt festgelegt:

1. eine Abweichung der Verdünnungsreihe ist statthaft, wenn kleiner als 0,10
2. Effizienzunterschiede in der PCR zwischen Standard und Ziel-DNA sind statthaft bis maximal 0,05
3. Unterschiede in der Schmelztemperatur sind nicht statthaft.
entsprechend Roche Molecular Biochemicals(a) 2000

Diese Parameter wurden von der Software ermittelt. Für die Auswertung der Daten war die Einhaltung der Parameter Voraussetzung.

4 Ergebnisse

4.1 FACS-Analysen an mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit Sézary Syndrom

Es wurden 15 Blutproben der Patienten mit Sézary Syndrom und vier Kontrollblutproben mittels FACS-Analyse untersucht und die Zellen mit Hilfe eines Cell-Sorters sortiert. Die Zellen wurden hierfür mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten monoklonalen Antikörpern gegen die T-Zell Antigene CD3, CD7 und CD26 in folgender Kombination gefärbt: CD3 mit CD7, CD3 mit CD26 und für die FACS-Analyse auch CD7 mit CD26. Avitale Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

4.1.1 CD7-Expression peripherer CD3⁺ Lymphozyten

Die Ergebnisse der Untersuchung der CD7⁺ und CD7⁻ Fraktion sind in Tabelle 8 als prozentuale Anteile der CD3 positiven Fraktion dargestellt.

Tab. 8: CD7 Expression der CD3⁺ PBMC

Blutprobe	Zellzahl CD3 ⁺ / μ l	FACS _{CD7} ⁺ (in % der CD3 ⁺)	FACS _{CD7} ⁻ (in % der CD3 ⁺)	Ratio der CD7 ⁺ /CD7 ⁻ der CD3 ⁺	CD7 Expressions muster
DK1	7,43	0,9	99,1	0,01	-
DK2	6,29	1,1	98,9	0,01	-
DK3a	5,98	1,1	98,9	0,01	-
DK3b	k.W.	1,3	98,7	0,01	-
FN1	1,57	86,2	13,8	6,25	+
FN2	0,71	60,0	40,0	1,5	+/-
FN3	1,03	86,0	14,0	6,14	+
FN4	0,91	76,6	23,4	3,27	+
OS1	1,05	60,2	39,8	1,51	+/-
OS2	1,13	65,7	34,3	1,92	+/-
RM1	7,32	53,5	46,5	1,15	+/-
RM2	k.W.	10,4	89,6	0,12	+/-
RM3	k.W.	26,9	73,1	0,37	+/-
SH1	4,3	54,9	45,1	1,22	+/-
SH2	2,5	46,4	53,6	0,87	+/-
Kontrolle	k.W.	90,0	10,0	9,0	+
Kontrolle	k.W.	91,4	8,6	10,63	+
Kontrolle	k.W.	87,7	12,2	7,19	+
Kontrolle	k.W.	90,8	9,2	9,87	+

+ → überwiegend CD7⁺ Expressionsmuster CD7⁺ >70%, +/- → intermediäres Expressionsmuster CD7⁺ zwischen 10% und 70%, - → überwiegend CD7⁻ Expressionsmuster CD7⁺ < 10%. FACS_{CD7}⁺ → Anteil der CD3⁺ CD7⁺ in %, FACS_{CD7}⁻ → Anteil der CD3⁺ CD7⁻ in %, k.W. → kein Laborwert bestimmt worden

Die FACS-Analyse ergab für die Kontrollen einen Anteil der $CD3^+CD7^+$ Population von 87,7% - 91,4%, die Lymphozyten zeigten somit ein $CD7^+$ Expressionsmuster. Die $CD7^+/CD7^-$ Ratio lag zwischen 7,19 und 10,63.

In den PBMC der Patienten mit Sézary Syndrom schwankte der Anteil der $CD3^+CD7^+$ von 0,9% - 86,2%. Zwischen den einzelnen Patienten war eine große Variabilität der Verteilung zu beobachten, jedoch war der Anteil der $CD7^+$ Population bei den Proben der Patienten signifikant geringer als bei den gesunden Kontrollen.

Bei Betrachtung der Daten deuten sich drei Expressionsmuster des CD7 Antigens an, denen die PBMC-Analysen zugeordnet werden können. So zeigte sich ein $CD7$ positives, ein $CD7$ negatives und ein $CD7^+/CD7^-$ intermediäres Expressionsmuster. Die Grenzen für die Zuordnung zu einer der drei Gruppen ließen sich wie folgt festlegen: $>70\%CD3^+CD7^+$ entsprach dem überwiegend positiven Expressionsmuster (s. Abb. 1a), bei unter 10% $CD3^+CD7^+$ erfolgte die Zuordnung zum überwiegend negativen Expressionsmuster (s. Abb. 1c). Alle Proben mit einem $CD3^+CD7^+$ Anteil zwischen 10 und 70% gehörten zum intermediären Expressionsmuster (s. Abb. 1b). Die Festlegung der Grenzen erfolgte in Anlehnung an Wood et al., Jakob et al. und Vonderheid et al. (Wood et al. 1990, Jakob et al. 1996, Vonderheid et al. 2001).

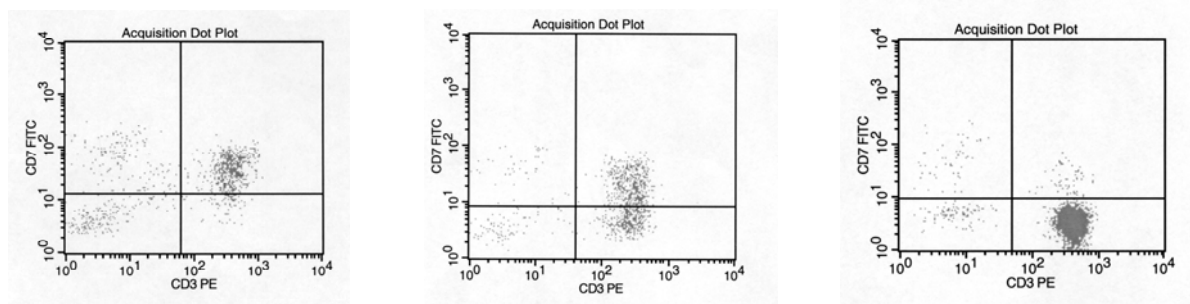


Abb. 1: $CD7$ Expression der $CD3^+$ Zellen

a: Bsp. für positives Expressionsmuster für $CD7$ (Kontroll-PBMC)

b: Bsp. für intermediäres Expressionsmuster für $CD7$ (RM1)

c: Bsp. für negatives Expressionsmuster für $CD7$ (DK2)

Zum $CD7$ positiven Expressionsmuster zählten die Kontrollen, die PBMC von FN1, FN3 und FN4. Ein $CD7$ negatives Expressionsmuster zeigten alle Proben von DK. Für die Proben von OS, RM, SH und FN2 ließ sich ein intermediäres Expressionsmuster nachweisen.

Im einzelnen stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar: Die Proben FN1, FN3 und FN4 enthielten Lymphozyten mit überwiegend $CD3^+CD7^+$ Phänotyp, deren Anteil zwischen 76,6 und 86% lag. Die Probe FN2 enthielt hingegen nur 60% $CD3^+CD7^+$ Zellen. Insgesamt zeigten im Vergleich zu den übrigen Patienten die Proben von FN, mit Ausnahme von FN2, den

höchsten Anteil $CD3^+CD7^+$ Zellen.

Im Gegensatz dazu war bei DK der konstant geringe Anteil von 0,9 bis 1,3% $CD3^+CD7^+$ Zellen im Blut auffällig.

Die PBMC des Patienten RM zeigten einen Abfall der CD7 positiven Zellen von 53,5% in RM1, auf 10,4% in RM2 und anschließend einen Anstieg auf 26,9% in der Probe RM3. Die Patienten OS und SH wiesen in ihren PBMC nur geringe Schwankungen in der $CD7^+/CD7^-$ Verteilung auf.

Das Verhältnis von $CD7^+/CD7^-$ unterlag im Verlauf zum Teil erheblichen Schwankungen. Diese Schwankungen zeigten sich in einem Fall in einer Zunahme, in einem Fall in einer Abnahme und in zwei Fällen in einer Kombination aus beidem. Einzig die CD7 Populationen in den PBMC von DK blieben konstant. Einen Wechsel des Expressionsmusters innerhalb eines Patienten zeigte nur FN. Im Verlauf wechselte das Muster von überwiegend positiv zu intermediär und wieder zu einem positiven Expressionsmuster. Eine Ursache könnte die starke Abnahme der absoluten $CD3^+$ Zellzahl im peripheren Blut aufgrund der Therapie sein.

Im Anschluss an die FACS-Analyse wurden auf Grundlage dieser Daten die $CD3^+CD7^+$ und die $CD3^+CD7^-$ Zellen jeder Probe mit Hilfe des *Cell-Sorters* präpariert. Die Zellen wurden der DNA Gewinnung zugeführt. Die Reinheit der Sortierung wurde durch nochmalige Analyse der sortierten Zellen im FACS überprüft. Sie überschritt in allen untersuchten Fällen 99% Reinheit (s.Abb 2).

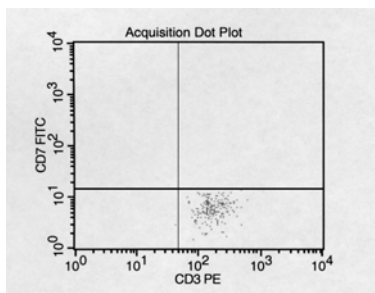


Abb. 2: Kontrolle der Reinheit der sortierten, $CD3^+/CD7^-$ Zellen

4.1.2 CD26 Expression peripherer CD3⁺ Lymphozyten

Die Ergebnisse der Analyse der CD26 Fraktionen in den PBMC sind in Tabelle aufgeführt. Sie sind als prozentuale Anteile an der CD3 positiven Fraktion dargestellt.

Tab. 9: CD26 Expression der CD3⁺ PBMC

Blutprobe	Zellzahl CD3 ⁺ / μ l	FACS _{CD26⁺} (in % der CD3 ⁺)	FACS _{CD26⁻} (in % der CD3 ⁺)	Ratio CD26 ⁺ /CD26 ⁻ der CD3 ⁺	CD26 Expressions muster
DK1	7,43	0,9	99,1	0,01	-
DK2	6,29	0,9	99,1	0,01	-
DK3a	5,98	0,9	99,1	0,01	-
DK3b	k.W.	0,9	99,1	0,01	-
FN1	1,57	16,7	83,3	0,2	+/-
FN2	0,71	25,1	74,9	0,34	+/-
FN3	1,03	34,7	65,3	0,53	+/-
FN4	0,91	57,7	42,3	1,36	+/-
OS1	1,05	5,6	94,4	0,06	-
OS2	1,13	7,2	92,8	0,78	-
RM1	7,32	4,3	95,7	0,04	-
RM2	k.W.	0,6	99,4	0,01	-
RM3	k.W.	0,8	99,2	0,01	-
SH1	4,3	1,8	98,2	0,02	-
SH2	2,5	3,2	96,8	0,03	-
Kontrolle	k.W.	71,0	29,0	2,45	+
Kontrolle	k.W.	76,4	23,6	2,90	+
Kontrolle	k.W.	80,6	19,4	4,15	+
Kontrolle	k.W.	74,6	25,4	2,94	+

+ → überwiegend CD26⁺ Expressionsmuster (CD26⁺ >70%), +/- → intermediäres Expressionsmuster (CD26⁺ zwischen 10% und 70%), - → überwiegend CD26⁻ Expressionsmuster (CD26⁺ <10%), FACS_{CD26⁺} → Anteil der CD3⁺CD26⁺ an CD26⁺ in %, FACS_{CD26⁻} → Anteil der CD3⁺CD26⁻ an den CD26⁻ in %, k.W. → kein Laborwert bestimmt worden

Der Anteil der CD3⁺CD26⁺ Zellen in den PBMC der Kontrollen lag im Bereich von 71,0% - 80,6%. Entsprechend nahm die CD26⁺CD26⁻ Ratio Werte zwischen 2,45 und 4,15 an.

In Analogie zur CD7 Expression konnten auch für die CD26 Expression drei Typen von Expressionsmustern festgelegt werden. Auch hier wurden die Grenzen für Positivität bei mehr als 70% positiven Zellen (s. Abb.3a), für Negativität bei weniger als 10% positiver Zellen (s. Abb.3c) und intermediär bei allen Werten zwischen 10 und 70% CD3⁺CD26⁺ Zellen (s. Abb.3b) festgelegt. Die Grenzen für die Betrachtungen wurden in Anlehnung an Untersuchungen von Bernengo et al. und Rappl et al. festgelegt (Bernengo et al. 2001, Rappl et al. 2001).

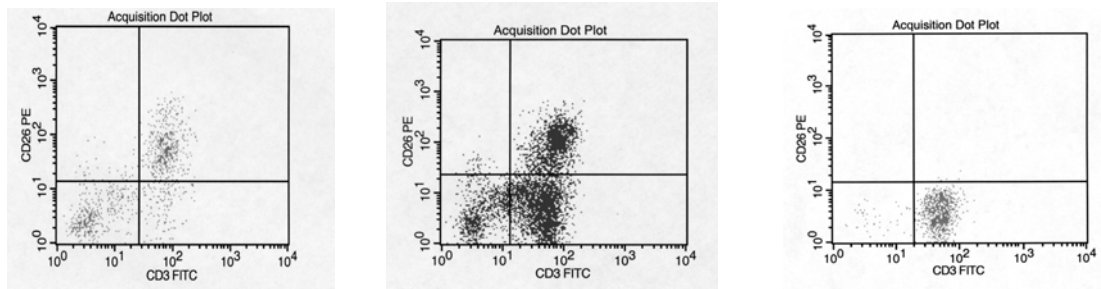


Abb. 3: CD26 Expression der CD3⁺ Zellen

- | | | |
|--|---|--|
| a) Bsp. für ein positives
Expressionsmuster von CD26
(Kontroll-PBMC) | b) Bsp. für ein intermediäres
Expressionsmuster von CD26 (FN3) | c) Bsp. für ein negatives
Expressionsmuster von CD26
(RM2) |
|--|---|--|

Bei FN kam es im Verlauf zu einer stetigen Zunahme der CD3⁺CD26⁺ Zellen, so betrug der Wert bei FN1 16,7%, bei FN2 25,1%, bei FN3 34,7% und bei FN4 57,7%. Die Verteilung der Populationen entsprach einem intermediären Expressionsmuster.

Die PBMC der weiteren Patienten zeigten einen sehr geringen Anteil an CD3⁺CD26⁺ Zellen. Dieser Anteil lag zwischen 0,6% - 7,2% und zeigte auch im Verlauf nur minimale Schwankungen. Somit entsprachen die Proben der Patienten DK, OS, RM und SH einem überwiegend negativem Expressionsmuster. Bei allen Patienten blieb der Typ des Expressionsmusters im Verlauf konstant.

Im Anschluss an die FACS-Analyse der CD3 und CD26 gefärbten Zellen wurden die CD3⁺CD26⁺ und die CD3⁺CD26⁻ Zellen mit Hilfe des *Cell-Sorters* präpariert. Die Zellen wurden der DNA Gewinnung zugeführt. (siehe 3.2) Die Reinheit der Sortierung, überprüft durch nochmalige Analyse der sortierten Zellen im FACS, überschritt bei den Proben 99% (s. Abb. 4).

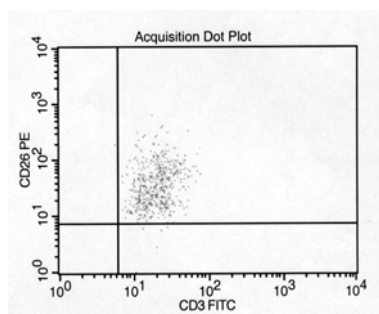


Abb. 4: Kontrolle der Reinheit der sortierten, CD3⁺/CD26⁺ Zellen

4.1.3 Korrelation der CD7 und CD26 Expressionsmuster

Um die Populationen der CD3⁺CD7⁺ und CD3⁺CD26⁺ Zellen zu vergleichen, wurden die Ergebnisse in Tabelle 10 gegenübergestellt. Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse

einem der drei Expressionsmuster (überwiegend positiv, überwiegend negativ, intermediär) zugeordnet.

Tab. 10: Korrelation von CD7 und CD26 Expressionsmustern

Blutprobe	FACS _{CD7}	FACS _{CD26}
DK1	-	-
DK2	-	-
DK3a	-	-
DK3b	-	-
FN1	+	+/-
FN2	+/-	+/-
FN3	+	+/-
FN4	+	+/-
OS1	+/-	-
OS2	+/-	-
RM1	+/-	-
RM2	+/-	-
RM3	+/-	-
SH1	+/-	-
SH2	+/-	-
Kontrolle	+	+
Kontrolle	+	+
Kontrolle	+	+
Kontrolle	+	+

+/- = intermediäre, + = positive, - = negative Expression des CD-Markers

Die Kontrollen zeigten sich sowohl für CD7 als auch für CD26 überwiegend positiv.

Im Blut der Sézary Syndrom Patienten konnte beobachtet werden, dass bei CD7 Negativität auch CD26 nicht exprimiert wurde (alle Proben von DK). Bei einem intermediären Expressionsmuster für CD7 konnte die CD26 Population entweder ebenfalls dem intermediären oder dem überwiegend negativen Typus zugeordnet werden. Dieses Verhalten zeigten die Proben FN2, alle Proben von OS, SH und RM. Bei überwiegend positivem Expressionsmuster von CD7 ließ sich ein intermediärer Typ von CD26 beobachten (FN1, FN3, FN4).

Ein CD26 negatives Expressionsmuster zeigte in vier Fällen ein negatives Expressionsmuster für CD7 (alle Proben von DK), in sieben Fällen ein intermediäres Muster für CD7 (alle OS, SH und RM) jedoch nie ein CD7 positives Muster.

Die Expression eines überwiegend intermediären CD26 Musters bedeutete auch die Expression eines intermediären bzw. positiven CD7 Expressionsmusters. In den untersuchten Proben fand sich nie die Konstellation einer intermediären CD26 Expression und gleichzeitig einer CD7 Negativität

Für die hier untersuchten Proben bedeuten die Ergebnisse, dass bei einem Abweichen der

CD7⁺ Zellverteilung in 12 Proben auch die CD26⁺ Zellzahl gegenüber den Kontrollen verändert war. Ist die CD26⁺ Zellverteilung verändert, lässt sich feststellen, dass in diesen 11 Proben die CD7⁺ Zellverteilung ein intermediäres oder negatives Muster aufwies.

4.2 Qualitative PCR-Analysen an PBMC von Sézary Syndrom Patienten

4.2.1 TCR- γ -PCR

Um das Vorhandensein eines T-Zell-Klons im peripheren Blut der fünf Patienten zu erfassen, wurden Aliquots von DNA mit Hilfe einer TCR- γ -PCR untersucht. Hierbei konnte in allen Proben eine T-Zell Klonalität festgestellt werden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde der expandierte T-Zell-Klon sequenziert.(s. Tabelle 11)

Tab. 11: Darstellung der Ergebnisse der TCR- γ Sequenzierung

Patient	TCR V-Segment	N-Region	J-Segment	Basenzahl N-Region	Verhältnis GC : AT	Klonspezifischer Primer generiert
SH	vg 8 - TGGGA	TGAAACTC	GAATT – jg1/2	8	0,6:1	Nein
DK	vg 3 - GACAG	AACGGGGGG	ACCAC – jg1/2	9	3,5:1	Ja
RM	vg 8 - TGGGA	AGGA	AATTA – jg1/2	4	1:1	Nein
FN	vg 9 - ACTAC	CG	TATATA – jg1/2	2	2:0	Nein
OS	vg 3 - GACAG	CACCCTTTTA	TTATT – jg1/2	10	0,66:1	Nein

Es ließ sich im Blut aller Patienten ein dominanter T-Zell-Klon sequenzieren. Die in den T-Zell-Klonen rearrangierten V-Segmente waren zweimal Vg8, zweimal Vg3 und einmal Vg 9. Die Länge der N-Region variierte erheblich. So waren bei FN nur zwei Nukleotide und bei RM nur vier Nukleotide während der Rekombination eingefügt worden. Hingegen war die Anzahl bei SH (8 Nukleotide), DK (9 Nukleotide) und OS (10 Nukleotide) wesentlich höher. Das Verhältnis von GC : AT lag im Durchschnitt bei 1,21 : 1. Aufgrund der verwendeten TCR-J γ Primer, war eine Unterscheidung von jg1 und jg2 nicht möglich.

4.2.2 TCR- β -PCR

Die Untersuchung auf das Vorhandensein eines dominanten TCR-V β Rearrangement fand mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern und einer FACS-Analyse statt. Von den Patienten, bei denen mit den verfügbaren V β -Antikörpern ein dominantes V β nachgewiesen werden konnte, wurde die DNA aus Blutproben dieser Patienten mit Hilfe einer TCR- β -PCR auf Klonalität untersucht. Ziel war es mit Hilfe der TCR- β -PCR die Sequenz des dominanten T-Zell-Klons zu ermitteln. Hierzu wurde die DNA in einer TCR- β -PCR eingesetzt, das dominante V β -Rearrangement mit V β -Primern und J β -Primern (Moss et al. 1997) amplifiziert und anschließend sequenziert. In der Tabelle sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

Tab. 12: Darstellung der Ergebnisse der V β Sequenzierung

Patient	V β	Sequenz V - Segment	N - Region	J-Segment	Basenzahl N-Region	Verhältnis GC : AT	Klonspezifischer Primer generiert
SH	16	vb 16s1 – CAAGA	TCTAGGGCCCC	AGATA - tbj 2-3	11	2,66 : 1	Ja
RM	17	vb 17s1 – GTAGT	GGAGGGCTTGGGGG	AAAAC - tbj 1-4	14	3,66 : 1	Ja
FN	17	vb17s1 – GTAGT	CTCCGGACAGGGAG	CTCCT - tbj1-6	14	2,5 : 1	Ja
OS	5	tbv5-1b – GCCAG	sCGCGACAG	CTCCT - tbj2-7	9	3,5 : 1	Ja
DK	k.R.	-	-	-	-	-	-

k.R. → durchgeführt, kein Resultat

Die Untersuchung auf eine dominante V β Familie ergab, dass V β 17 zweimal, V β 5 und V β 16 je einmal vorkamen. Der T-Zell-Klon von DK exprimierte ein V β , das mit keinem derzeit verfügbaren Antikörper angezeigt werden konnte. Deshalb konnte die V β -Sequenz des expandierten T-Zell-Klons bei DK nicht ermittelt werden.

Die N-Region der β -Sequenz der einzelnen T-Zell-Klone hatte eine Größe zwischen 9 und 14 Basen. Auffällig war ein hoher GC-Gehalt der Sequenz, das Verhältnis von GC : AT lag in allen Fällen über 2,5 : 1. Die J-Segmente zeigten die erwartete Diversität. So waren jeweils einmal J β 1-4, J β 1-6, J β 2-3 und J β 2-7 rearrangiert.

4.2.3 Patientenspezifische PCR

Nachdem die Sequenz des dominanten T-Zell-Klon bestimmt war, wurde mit Hilfe der Oligo[®]-Software für jede TCR-Sequenz ein Primer-Set, d.h. ein TCR-V-Primer und ein für die N-Region spezifischer Primer, entwickelt. Die Sequenz der N-Region spezifischen Primer, der dazugehörige V-Primer, die Annealingtemperatur, die Schmelztemperatur des PCR-Produkts und die Größe des PCR-Produkts sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tab. 13: Übersicht über die klonspezifischen Primer

Patient	V-Primer	N-Primer	Schmelz- temperatur des N-Primer (in °C)	Größe des PCR- Produkt (Anzahl Basenpaare)	Schmelz- temperatur des PCR-Produktes (in °C)
DK	V γ 18 (Muche 1995) CTACATCCACTGGTACCT	Kant1 GGTCCCCCGTTG	74,1	219	88,8
SH	V β 16 (Moss et al. 1997) TGTGACCAATTTCTGGA CATGATAAT	HeiB1 TCTGGGGGCCCTAGAT	72,0	239	86,1
RM	V β 17 (Moss et al. 1997) GAACAGAATTTGAACCA CGATGCC	MurB1 CAGTTTTCCCCAAGCC CTCC	72,0	234	88,4
FN	V β 17 (Moss et al. 1997) GAACAGAATTTGAACCA CGATGCC	Neb3 GTGAATTATAGGAGCT CCCTG	71,4	241	88,2
OS	V β 5 (Moss et al. 1997) CTGATCAAAACGAGAGG ACAGCA	SelbB1 AGGAGCTGTGCGSCT	71,1	262	90,2

Die Länge der V-Primer lag zwischen 18 und 27 Basen, die der N-Primer zwischen 16 und 21 Basen.

Bei der Entwicklung einer klonspezifischen PCR hatte die Größe der N-Region und das Verhältnis von GC : AT entscheidenden Einfluss auf die Spezifität der PCR. So war die Entwicklung eines klonspezifischen Primers für die TCR- γ -Sequenz nur bei DK möglich, hier N-Region eine ausreichende Länge und einen hohen GC-Gehalt zeigte. Die N-Regionen der übrigen Patienten zeigten eine zu geringe Größe (FN: 2bp, RM: 4bp) bzw. einen geringeren GC-Gehalt (SH 0,6 : 1, OS 0,66 : 1). Demgegenüber zeigte die N-Region der β -Sequenz eine ausreichende Größe und GC-Gehalt. Hier wurde mit allen entwickelten Primern die angestrebte Spezifität erreicht.

Charakteristisch für die Primer zur Amplifizierung des klonspezifischen TCR- β -Rearrangements ist eine hohe Schmelztemperatur (71,1° - 74,1°C) und eine hohe Schmelztemperatur der PCR-Produkte (86,1° - 90,2°C). Die Länge der PCR-Produkte lag zwischen 239 und 262 Basenpaaren.

Für jedes Primerpaar wurden spezifische PCR-Bedingungen entwickelt. Die PCR-Bedingungen wurden an der DNA aus PBMC des jeweiligen Patienten getestet und, wenn nötig, variiert um eine hohe Spezifität zu erreichen. Dazu wurde die Annealingtemperatur der PCR so hoch wie möglich gewählt. Darüber hinaus wurde die PCR auch hinsichtlich der Zyklenzahl, der verwendeten Taq-Polymerase und der Magnesiumkonzentration optimiert. Ziel war eine spezifische Amplifizierung des Zielgenes ohne Entstehung unspezifischer PCR-Produkte und Primerdimere. Die PCR-Bedingungen für die einzelnen Patienten sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: PCR-Programme

Patient	[MgCl ₂] (in mM)	Annealingtemperatur (in °C)	Zyklenzahl
SH	4	66	35
DK	4	60	35
RM	4	68	35
FN	2,5	66	30
OS	2,5	66	30

Mit Hilfe dieser PCR-Bedingungen konnte bei allen Patienten ein Amplifikat der erwarteten Größe erzielt werden. In den Kontrollen mit polyklonaler DNA aus PBMC von Spendern bzw. mit H₂O ließen sich keine PCR-Amplifikate nachweisen (s. Abb. 5).

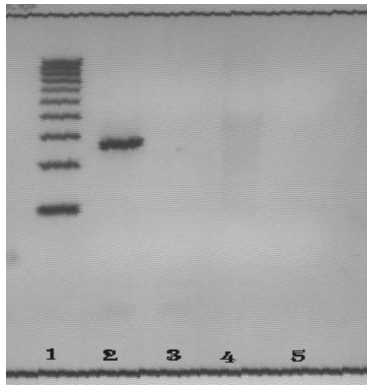


Abb. 5: Bsp. für ein Ergebnis einer klon-spezifischen PCR (für SH), Auftrennung im Agarosegel

Spurlegende

1. 100bp Marker 2. PBMC von SH 3. Kontroll-PBMC 4. Kontroll-PBMC 5. Negativkontrolle (H₂O)

Nach der Analyse der PBMC der Patienten im FACS und der Präparation der einzelnen Subpopulationen mittels FACS-Sorting, wurde die DNA dieser Zellen in einer klon-spezifischen PCR eingesetzt. Das Vorhandensein von T-Zellen wurde zusätzlich in einer TCR- γ -PCR überprüft. Die Ergebnisse sind für alle Zellpopulationen in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Ergebnisse der klon-spezifischen PCR

Blutprobe	CD3 ⁺ CD7 ⁺	CD3 ⁺ CD7 ⁻	CD3 ⁺ CD26 ⁺	CD3 ⁺ /CD26 ⁻
DK1	-*	+	-*	+
DK2	-*	+	-*	+
DK3a	-*	+	-*	+
DK3b	-*	+	-*	+
FN1	+	+	+	+
FN2	+	+	+	+
FN3	+	+	+	+
FN4	+	+	+	+
OS1	+	+	+	+
OS2	+	+	+	+
RM1	+	+	-	+
RM2	+	+	-*	+
RM3	+	+	-*	+
SH1	+	+	+	+
SH2	+	+	+	+

+ → positives PCR-Ergebnis, - → negatives PCR-Ergebnis, -* → negatives PCR-Ergebnis mit Hilfe der LightCycler[®] PCR gezeigt (s.Text)

Mit Hilfe des klon-spezifischen Primers konnte der initiale T-Zell-Klon auch in allen folgenden Proben nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Subpopulationen, in denen der initiale Klon auch im Verlauf nachweisbar blieb.

Die Untersuchung der einzelnen Populationen ergab, dass in allen T-Zell Populationen ein für

das TCR-Rearrangement identischer Klon vorhanden war. Damit konnte gezeigt werden, dass dieser Klon für CD7 sowie für CD26 jeweils sowohl positiv als auch negativ sein kann. Gleichzeitig heißt das auch, dass der T-Zell-Klon keinen konstanten Phänotyp zeigte. So wurde der expandierte TCR-Klon in 11/15 Proben in der CD3⁺CD7⁺ Population nachgewiesen, in 15/15 Proben in der CD3⁺CD7⁻ Population, in 8/15 Proben in der CD3⁺CD26⁺ Population und in 15/15 Proben der CD3⁺CD26⁻ Population. Aufgrund der zum Teil sehr kleinen Populationen war es bei DK und RM nicht möglich, ausreichend Material von allen Population zu gewinnen. Dies betraf im einzelnen die CD7⁺ Fraktion und CD26⁺ Fraktion aller Proben von DK und die CD26⁺ Fraktion von RM2 und RM3. Hier wurde die präparierte DNA in der LightCycler[®] PCR mit klonspezifischen Primern eingesetzt und das Ergebnis dieser PCR für das Ergebnis der qualitativen PCR übernommen.

Die Klonalität in den einzelnen T-Zell-Populationen der Patienten konnte auch im Verlauf konstant nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme bildet die Probe der CD3⁺CD26⁺ Zellen von RM1, dieser Population war kein Amplifikat in der qualitativen PCR zu erzielen.

Für die Patienten FN, OS und SH war in allen untersuchten Proben und Populationen der initiale T-Zell-Klon nachweisbar. Für den Patienten DK war eine nur für die CD7 negativen und CD26 negativen Population eine reine qualitative Untersuchung möglich. Hier zeigte sich in allen Proben der initiale Klon. Für die CD7⁺ und die CD26⁺ Fraktion wurden die Ergebnisse aus der quantitativen PCR übernommen. Hier konnten keine klonalen Zellen quantifiziert werden, so dass diese Populationen als negativ hinsichtlich der Klon-Präsenz bewertet wurden. Für RM wurde analog zu DK verfahren. Auch hier konnte in den betreffenden Proben RM2 und RM3 in der CD26⁺ Fraktion keine klonalen Zellen quantifiziert werden, so dass diese Populationen als negativ für den Klon bewertet wurden.

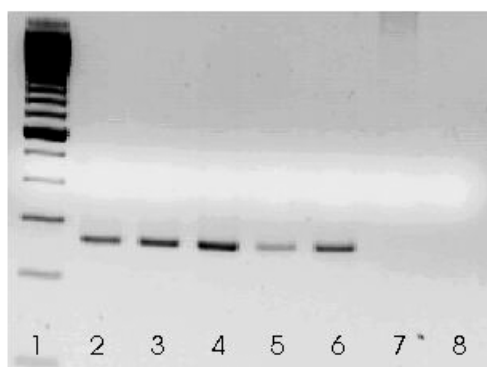


Abb. 6: Bsp. für eine klonspezifische PCR an sortierten Zellen (OS vom 04.08.00), Auftrennung im Agarosegel

Spurlegende:

- | | | | |
|---|---|---|--|
| 1. 100bp Marker | 2. CD3 ⁺ CD7 ⁺ Zellen | 3. CD3 ⁺ CD7 ⁻ Zellen | 4. CD3 ⁺ CD26 ⁺ Zellen |
| 5. CD3 ⁺ /CD26 ⁻ Zellen | 6. Positivkontrolle | 7. Negativkontrolle (PBMC) | 8. Negativkontrolle (H ₂ O) |

4.3 Quantitative PCR-Analysen an PBMC von Patienten mit Sézary Syndrom

4.3.1 Entwicklung der PCR-Bedingungen für eine quantitative PCR im LightCycler®

Um eine Aussage darüber zu erhalten, wie hoch der Anteil der klonalen Zellen in den einzelnen T-Zell Populationen ist, musste eine quantitative PCR durchgeführt werden. Dazu wurden die Bedingungen der klonspezifischen PCR an die Bedingungen im LightCycler® angepasst.

Um optimale Bedingungen für die PCR im LightCycler® zu erreichen, wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellerprotokolls verfahren (Roche Molecular Biochemicals(a) 2000). In einzelnen wurden die Anlagerungstemperatur der Primer (*Annealingtemperatur*) die Elongationszeit und die MgCl₂ Konzentration angepasst. Da schon von der qualitativen PCR bekannt war, dass die Primer höhere Anlagerungstemperaturen haben, wurde mit einer höheren Temperatur begonnen. Um einen unspezifischen Hintergrund in der Amplifizierung zu vermeiden und die Entstehung von Primerdimeren zu reduzieren, wurde die Anlagerungstemperatur so hoch wie nötig gewählt. Für die MgCl₂ Konzentration empfiehlt das Protokoll eine Konzentration von 1mM bis 5mM.

Die Anlagerungstemperatur, die Temperatur der Messung der Fluoreszenzintensität (I_F) und die eingesetzte MgCl₂ Konzentration sind in der Tabelle 16 aufgeführt. Die Temperatur während der Elongation und die Zyklenzahl betragen einheitlich 72°C und 50 Zyklen.

Tab. 16: PCR-Programme für den LightCycler®

Patient	Annealing – temperatur (in °C)	Messung von I _F bei (in °C)	[MgCl ₂] (in mM)
DK	70	80	2,5
SH	70	82	2,5
RM	65	79	4
FN	66	82	4
OS	60	79	4

Bei der Sortierung der Zellen wurden Zellen jeder Population gewonnen. Die Menge der gewonnenen Zellen wurde durch die Größe der Subpopulation bestimmt, es wurde versucht, so viele Zellen wie möglich zu gewinnen. Die Zellzahl nach der Separation lag zwischen $2,5 \times 10^4$ und $1,25 \times 10^5$ Zellen. Anschließend wurden die Zellen einer DNA-Extraktion zugeführt. Danach wurde die Anzahl Kopien DNA (2 Kopien pro Zelle) pro Volumeneinheit berechnet und die quantitative PCR mit DNA aus 5×10^3 Zellen durchgeführt. D.h. für jede Zellpopulation wurden, um bei gleicher PCR-Effizienz zu quantifizieren, unabhängig vom

realen Anteil im Blut des Patienten 5×10^3 Zellen eingesetzt. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der quantitativen PCR auf die reale Verteilung der einzelnen Populationen umgerechnet und die Ratio der $CD7^+ / CD7^-$ bzw. $CD26^+ / CD26^-$ klonalen Zellen ermittelt.

Die Nachweisgrenze dieser Technik liegt bei ca. 10^2 klonalen Zellen je Ansatz von 5×10^3 Zellen.

4.3.2 Quantifizierung der $CD7^+$ und $CD7^-$ Fraktion

Tabelle 17 stellt die Ergebnisse der quantitativen PCR für $CD3^+CD7^+$ bzw. $CD3^+CD7^-$ Zellfraktionen des peripheren Blutes dar. Zum einen sind die Absolutzahlen aufgeführt, zum anderen die Verteilung der $CD7^+ / CD7^-$ klonalen Zellen bei einem theoretischen Verhältnis der $CD7^+ / CD7^-$ der $CD3^+$ Zellen von 1:1 und des weiteren die Ratio der $CD7^+$ zu den $CD7^-$ klonalen Zellen ($R_{CD7^+ / CD7^-}$) für das reale Verhältnis der $CD7^+ / CD7^-$ Zellen in der $CD3^+$ Zellpopulation. Für die Berechnung der Ratio $R_{CD7^+ / CD7^-}$ wurde die reale Verteilung der $CD7^+ / CD7^-$ Populationen, ermittelt mit Hilfe der FACS-Analyse (A_2), ins Verhältnis zu der Verteilung der klonalen Zellen auf die $CD7^+ / CD7^-$ Populationen (A_1) gesetzt, woraus sich folgende Formel ergab:

$$R_{CD7^+ / CD7^-} = A_1 \times A_2, \text{ wobei}$$

$$A_1 = LC_{CD7^+} / LC_{CD7^-}$$

$$A_2 = FACS_{CD7^+} / FACS_{CD7^-}$$

Tab. 17: Ergebnisse der quantitativen PCR der nach der CD7 Expression sortierten Zellen

Blutprobe	$CD3^+CD7^+$	$CD3^+CD7^-$	LC_{CD7^+}	LC_{CD7^-}	$R_{CD7^+ / CD7^-}$
DK1	0,0	$4,57 \times 10^3$	$<1,0^*$	$>99,0^*$	$<0,0001^*$
DK2	0,0	$7,05 \times 10^3$	$<1,0^*$	$>99,0^*$	$<0,0001^*$
DK3a	0,0	$1,08 \times 10^4$	$<1,0^*$	$>99,0^*$	$<0,0001^*$
DK3b	0,0	$8,94 \times 10^3$	$<1,0^*$	$>99,0^*$	$<0,0001^*$
FN1	$6,44 \times 10^4$	$7,69 \times 10^3$	89,3	10,7	52,16
FN2	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
FN3	$7,13 \times 10^3$	0,0	$>98,6^*$	$<1,4^*$	$>429,4^*$
FN4	$8,50 \times 10^3$	0,0	$>98,8^*$	$<1,2^*$	$>269,1^*$
OS1	$1,10 \times 10^4$	$1,20 \times 10^4$	47,8	52,2	1,38
OS2	$4,60 \times 10^4$	$6,27 \times 10^4$	42,3	57,7	1,4
RM1	$6,58 \times 10^3$	$7,66 \times 10^3$	46,2	53,8	0,98
RM2	$5,06 \times 10^3$	$5,05 \times 10^3$	50,0	50,0	0,12
RM3	$7,26 \times 10^3$	$7,07 \times 10^3$	50,7	49,3	0,38
SH1	0,0	$1,6 \times 10^3$	$<0,9^*$	$>99,1^*$	$<0,01^*$
SH2	$3,64 \times 10^3$	$2,84 \times 10^3$	56,2	43,8	1,11

LC_{CD7^+} → Anteil $CD7^+$ in % an den $CD3^+$ klonalen Zellen, LC_{CD7^-} → Anteil $CD7^-$ in % an den $CD3^+$ klonalen Zellen, k.P. → kein Produkt in der quantitativen PCR, * → für negativen Wert in der Quantifizierung wurde von weniger als 10^2 klonalen Zellen in dieser Population ausgegangen, $R_{CD7^+ / CD7^-}$ → Ratio der klonalen $CD3^+CD7^+$ zu den klonalen $CD3^+CD7^-$

Die quantitative PCR der 15 Patientenproben ergab, dass in 14/ 15 Proben eine Amplifikation mit Hilfe der Klon-spezifischen Primer möglich war. Die Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Quantitativen PCR von CD7⁺ und CD7⁻ Zellen. Es sind die Standardkurven, die Kurven der amplifizierten DNA und die Negativkontrolle dargestellt. In Abb.8 ist die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse dargestellt.

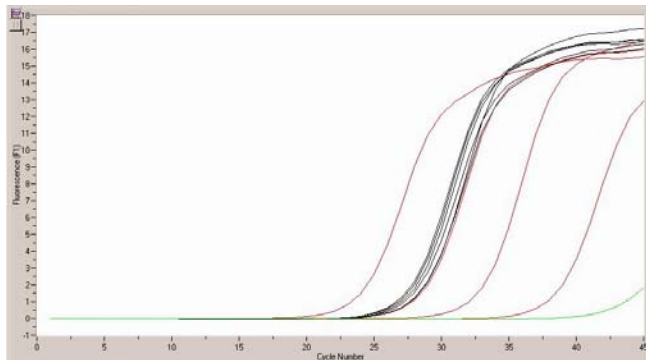


Abb. 7: Bsp. für eine quantitative PCR (CD7⁺ und CD7⁻ Populationen von RM)

Legende: rote Kurven → Fluoreszenz der Standardverdünnungsreihe
schwarze Kurven → Fluoreszenz der amplifizierten DNA
grüne Kurve → Fluoreszenz der negativ Kontrolle(H₂O)

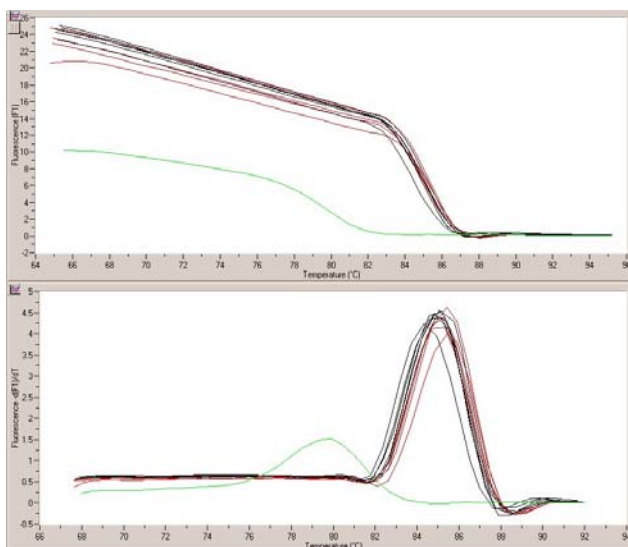


Abb. 8: Schmelzkurvenanalyse der quantitativen PCR aus Abb.7

Legende wie in Abb.7

Die Untersuchung zeigte, dass in der CD7 positiven Population in 9/15 Fällen und in der CD7 negativen Population in 12/15 Fällen ein Amplifikat zu erzielen war. In den Fällen, in denen die Quantifizierung 0 ergab, muss davon ausgegangen werden, dass hier weniger als 10² klonale Zellen vorhanden waren. Aus diesem Grund wurde zur Berechnung der Ratio ein Wert von 10² klonale Zellen angenommen. Im Vergleich zur qualitativen PCR zeigt sich, dass

in 5/30 quantitativen Analysen keine Amplifikation im LightCycler® System erfolgte, obwohl der entsprechende T-Zell-Klon in der qualitativen PCR nachgewiesen wurde. Das betrifft im einzelnen die Probe von FN2, wo Klonalität in der qualitativen PCR, nicht jedoch in der quantitativen PCR für beide Populationen $CD3^+CD7^+$ und $CD3^+CD7^-$ gezeigt wurde. Weiterhin betrifft dies die Proben von FN3 und FN4, bei denen die Klonalität der $CD3^+CD7^-$ Fraktion nur in der qualitativen PCR Klonalität gezeigt werden konnte. Außerdem ist auch die Probe SH1 betroffen, bei der in der $CD3^+CD7^+$ Fraktion die quantitative PCR kein Ergebnis brachte. In diesen Fällen waren entweder keine klonalen Zellen vorhanden oder deren Zahl unterschritt die Nachweisgrenze der quantitativen PCR.

Im Verlauf zeichnet sich für die Gesamtheit der Patienten ein uneinheitliches Bild ab. So ist aus den einzelnen, auf die reale Verteilung der $CD3^+CD7^+$ bzw. $CD3^+CD7^-$ Zellen angepasste Ratio $R_{CD7^+/CD7^-}$ ersichtlich, dass im Verlauf sowohl eine Veränderung des Phänotyps der klonalen Zellen zur $CD7^+$ aber auch zur $CD7^-$ Population stattfindet, als auch ein konstanter Phänotyp der klonalen Zellen auftritt (s. Tab.17).

In den Proben von FN ließen sich klonal expandierte Zellen v.a. in der $CD7^+$ Population nachweisen. Im Verlauf kam es zu einer Zunahme der klonalen $CD7^+$ Population, was sich in den hohen Werten von $R_{CD7^+/CD7^-}$ widerspiegelt. So stieg $R_{CD7^+/CD7^-}$ im Verlauf von 52,1 über 429,4 auf 269,1 an. Für die Beurteilung der Werte von FN vom 15.01.02 und 26.03.02 ist zu berücksichtigen, dass es zu einer stetigen Zunahme einer $CD3dim$ Population kam, die in der letzten Probe alle anderen Populationen dominierte. Auf diese Besonderheit wird in 4.5 eingegangen.

Für DK ergab die Quantifizierung der $CD7^-$ Fraktion Werte zwischen $4,57 \times 10^3$ und $1,08 \times 10^4$ klonale Zellen. Im Verlauf zeigte sich von der Probe DK1 bis zur Probe DK3b eine stetige Zunahme der klonalen Zellen von $4,57 \times 10^3$ bis auf $1,08 \times 10^4$. In der $CD7^+$ Fraktion konnten keine klonalen Zellen quantifiziert werden. $R_{CD7^+/CD7^-}$ blieb für DK im Verlauf konstant bei unter 0,0001, was einem überwiegend $CD7^-$ Phänotyp der klonal Zellen entspricht.

Die Proben von OS, RM und SH zeigten, mit Ausnahme von SH1, eine Verteilung der klonalen Zellen sowohl auf die $CD3^+CD7^+$ als auch auf die $CD3^+CD7^-$ Zellpopulationen. Wie aus den Ratios $R_{CD7^+/CD7^-}$ ersichtlich, blieb die Verteilung bei OS fast konstant ($R_{CD7^+/CD7^-}$ lag bei 1,38 und 1,4), bei RM kam es zu einer Verschiebung hin zur $CD3^+CD7^-$ (Abfall der Ratio von 0,98 auf 0,12 und leichter Anstieg auf 0,38). Die Ratio $R_{CD7^+/CD7^-}$ für die Proben von SH war zunächst kleiner 0,01 und stieg dann auf 1,11 an. Dies erscheint jedoch auch in Anbetracht der qualitativen PCR-Ergebnisse eher unrealistisch, so dass von einem Messfehler für die $CD7^+$ Fraktion der Probe SH1 ausgegangen werden muss. Die Quantifizierung dieser

Probe wurde wiederholt, mit unverändertem Ergebnis. Für weitergehende Untersuchungen stand kein Material zur Verfügung.

4.3.3 Quantifizierung der CD26⁺ und CD26⁻ Fraktion

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der quantitativen PCR für CD3⁺CD26⁺ bzw. CD3⁺CD26⁻ Zellfraktionen des peripheren Blutes. Die Darstellung der Daten wurde analog zu den CD7 Fraktionen vorgenommen.(s. 4.3.2) Auch die Berechnung der Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben.

Tab. 18: Ergebnisse der quantitativen PCR der nach der CD26 Expression sortierten Zellen

Blutprobe	CD3 ⁺ CD26 ⁺	CD3 ⁺ CD26 ⁻	LC _{CD26⁺}	LC _{CD26⁻}	R _{CD26⁺/CD26⁻}
DK1	0,0	3,49x10 ³	<2,8*	>97,2*	<0,0003*
DK2	0,0	1,20x10 ⁴	<0,8*	>99,2*	<0,0001*
DK3a	0,0	1,48x10 ⁴	<0,7*	>99,3*	<0,0001*
DK3b	0,0	1,42x10 ⁴	<0,7*	>99,3*	<0,0001*
FN1	1,74x10 ³	2,56x10 ⁴	6,4	93,6	0,01
FN2	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
FN3	1,67	1,59x10 ³	0,1	99,9	0,0005
FN4	4,96x10 ²	0,0	>98,0*	<2,0*	>160,2*
OS1	0,0	3,39x10 ⁴	<0,0*	100,0*	0,0002*
OS2	0,0	4,64x10 ⁴	0,0*	100,0*	0,0002*
RM1	1,39x10 ³	8,82x10 ³	13,6	86,4	0,006
RM2	0,0	9,18x10 ³	<1,1*	>98,9*	0,0001*
RM3	0,0	7,57x10 ³	<1,3*	>98,7*	0,0001*
SH1	k.P.	2,1x10 ³	k.P.	k.P.	k.P.
SH2	4,59x10 ³	3,47x10 ³	56,9	43,1	0,04

LC_{CD26⁺} → Anteil CD26⁺ in % an den CD3⁺ klonalen Zellen, LC_{CD26⁻} → Anteil CD26⁻ in % an den CD3⁺ klonalen Zellen, k.P. → keine verwertbare quantitative PCR, * → für negativen Wert in der Quantifizierung wurde von weniger als 10² klonalen Zellen in dieser Population ausgegangen, R_{CD26⁺/CD26⁻} → Ratio der klonalen CD3⁺CD26⁺ zu den klonalen CD3⁺CD26⁻

Analog zur quantitativen PCR der CD7 Fraktionen ließ sich in dieser Analyse ebenfalls in 14/ 15 Patientenproben ein Amplifikat erzielen. In Abb.9 ist das Ergebnis einer quantitativen PCR von CD26⁺ und CD26⁻ T-Zell Populationen dargestellt. Die Abbildung beinhaltet die Standardverdünnungsreihe, die Fluoreszenzkurven der amplifizierten DNA und die der negativ Kontrolle. In Abb.10 ist die dazugehörige Schmelzkurvenanalyse dargestellt.

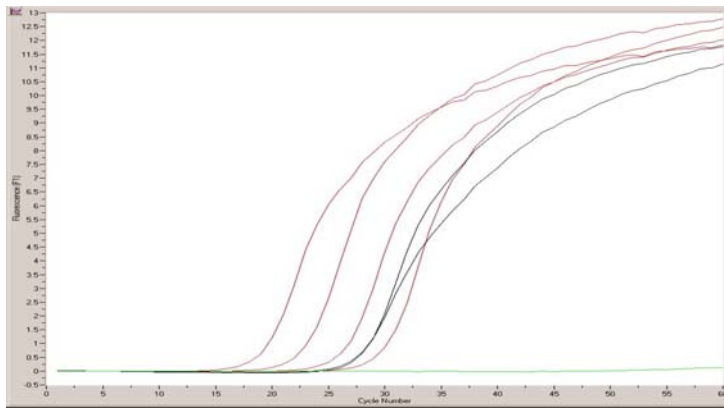


Abb. 9: Bsp. für eine quantitative PCR der CD26⁺ und CD26⁻ Populationen (von SH)

Legende: rote Kurven → Fluoreszenz der Standardverdünnungsreihe
schwarze Kurven → Fluoreszenz der amplifizierten DNA
grüne Kurve → Fluoreszenz der negativ Kontrolle(H₂O)

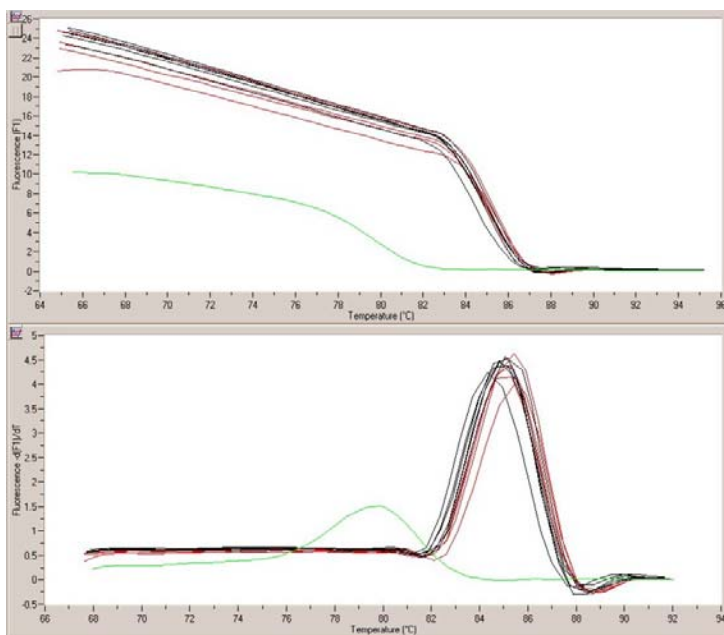


Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse der quantitativen PCR aus Abb.9

Legende wie in Abb.9

Die Untersuchung der einzelnen CD26 Populationen zeigte, dass in der CD26⁺ Population nur in sechs Fällen und in der CD26⁻ Population in 13/15 Fällen klonale Zellen quantifiziert werden konnten. Hier lag die Ursache zum einen darin, dass keine klonalen Zellen vorhanden waren oder deren Zahl die Nachweisgrenze von 10² klonale Zellen unterschritt. In den drei Fällen, mit k.P. gekennzeichnet, konnte die Quantifizierung trotz Wiederholung wegen nicht

reproduzierbarer Ergebnisse nicht ausgewertet werden. Im Vergleich zur qualitativen PCR zeigt sich, dass in 7/30 quantitativen Analysen kein Amplifikat zu erzielen war, trotz eines nachweisbaren T-Zell-Klons in der qualitativen PCR. Dies betrifft im einzelnen die Probe von FN2, hier sowohl die $CD3^+CD26^+$ als auch die $CD3^+CD26^-$ Population und die Proben FN4, OS1, OS2 und SH1 hier die Zellen der $CD3^+CD26^-$ Population. Für die T-Zell Populationen der Proben FN4, RM, OS und DK, in denen keine klonalen Zellen nachgewiesen wurden, unterschritt deren Zahl die Nachweisgrenze bzw. es waren keine klonalen T-Zellen in diesen Populationen vorhanden. Bei SH1 und FN2 wurde die Untersuchung mehrfach mit widersprüchlichen Ergebnissen wiederholt, so dass hier von einem Messfehler ausgegangen werden muss, da in der qualitativen PCR ein positives Ergebnis gezeigt werden konnte.

Mit einer Ausnahme, der Probe FN4, lag die auf die reale Verteilung der $CD3^+CD26^+$ bzw. $CD3^+CD26^-$ Zellen angepasste Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ konstant für alle Proben unter 0,04, was bedeutet, dass die klonale Zellen überwiegend $CD26^-$ waren.

Für FN lassen sich die Ergebnisse nur für die Proben FN1 und FN3 verwerten, hier lag die Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ für beide Proben unter 0,01. Für die Probe FN2 ließen sich trotz wiederholter PCR-Ansätze keine Ergebnisse generieren. Das Ergebnis der Quantifizierung der $CD3^+CD26^-$ Zellen für die Probe FN4 muss mit Vorbehalt betrachtet werden, da es in dieser Probe eine dominierende $CD3dim$ Population gab.

Für die Proben von DK, ließ sich nur in den $CD26^-$ Populationen ein T-Zell-Klon nachweisen, in der $CD26^+$ Fraktion konnten keine klonalen Zellen gezeigt werden, die Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ lag konstant unter 0,0003.

Für OS, RM und SH2 ergab eine Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ von 0,04, welche auch unverändert in allen Proben blieb und auf einen dominanten Klon mit $CD26^-$ Phänotyp hindeutet. Für die Probe SH1 ließ sich in der $CD26^+$ Population keine Quantifizierung erreichen.

4.3.4 Korrelation der PCR- und FACS-Ergebnisse

Für die Gegenüberstellung der Daten der FACS-Analyse und der Daten der Quantifizierung wurden die CD7 bzw. CD26 Expressionen der CD3 Populationen, wie sie sich in der FACS-Analyse darstellten, mit den Ratios $R_{CD7^+/CD7^-}$ bzw. $R_{CD26^+/CD26^-}$, und damit der CD7 bzw. CD26 Expression der klonalen Zellen, verglichen. Zur Veranschaulichung sind die Daten in Tabelle 19 gegenübergestellt.

Tab. 19: Gegenüberstellung der quantitativen PCR-Daten und der FACS-Daten

Blutprobe	R _{CD7⁺/CD7⁻}	FACS _{CD7}	R _{CD26⁺/CD26⁻}	FACS _{CD26}
DK1	<0,0001	-	<0,0003	-
DK2	<0,0001	-	<0,0001	-
DK3a	<0,0001	-	<0,0001	-
DK3b	<0,0001	-	<0,0001	-
FN1	52,16	+	0,01	+/-
FN2	k.P.	+/-	k.P.	+/-
FN3	>429,4	+	0,0005	+/-
FN4	>269,1	+	>160,2	+/-
OS1	1,38	+/-	0,0002	-
OS2	1,4	+/-	0,0002	-
RM1	0,98	+/-	0,006	-
RM2	0,12	+/-	0,0001	-
RM3	0,38	+/-	0,0001	-
SH1	<0,01	+/-	k.P.	-
SH2	1,11	+/-	0,04	-

Die Auswertung für die CD7⁺ und CD7⁻ Populationen zeigte, dass die Ergebnisse der FACS-Analyse in 12/15 Fällen mit den Daten der LightCycler[®]-Analyse übereinstimmen. Hierzu wurde verglichen, welches Antigenmuster der T-Zell-Klon aufwies und ob sich in der Probe mit dem T-Zell-Klon auch eine dominante T-Zell Population in der FACS-Analyse finden ließ.

Für FN ergab sich folgendes Bild: Bei Betrachtung der Verteilung der klonalen Zellen zeigte sich ein dominanter CD7⁺ Klon, in der FACS-Analyse stellte sich, mit Ausnahme von FN2 mit einem intermediären Typ, ein positiver Verteilungstyp dar. Für die CD26 Population konnte für FN1 und FN3 ein dominanter Klon in der CD26⁻ Population gezeigt werden, bei intermediärem Typ in der FACS-Analyse. Das bedeutet für FN, dass die klonalen Zellen überwiegend CD7⁺ und CD26⁻ sind und die alleinige FACS-Analyse keinen eindeutigen Rückschluss auf die Verteilung der klonalen Zellen zulässt.

In den Proben von DK konnte sowohl in der CD7 als auch in der CD26 Population kein Klon nachgewiesen werden. In der FACS-Analyse konnte diese dominante Verteilung auf die negativ Populationen ebenfalls gezeigt werden, so dass hier bereits die FACS-Analyse der CD3⁺ Zellen auf die Phänotypen der klonalen Zellen schließen lässt.

Für die Proben der Patienten OS, RM und SH konnte, mit Ausnahme von SH1, eine Verteilung der klonalen Zellen sowohl auf die CD7⁺ als auch auf die CD7⁻ Population gezeigt werden. Für die Proben stellte sich in der FACS-Analyse ebenfalls ein intermediäres Verteilungsmuster dar. Desweiteren zeigten sich die klonalen Zellen dominant in der CD26⁻ Population. In der FACS-Analyse der CD26-Populationen zeigte sich ein negativer Expressionstyp. Somit lässt sich für die CD7- und CD26-Population bereits von der FACS-Analyse der CD3⁺ Zellen auf den Phänotyp der klonalen Zellen schließen.

4.4 Korrelation der Analysen mit klinischen Befunden

4.4.1 Klinische und paraklinische Befunde

In Tabelle 20 sind für die einzelnen Patienten und untersuchten Proben die Daten der Erstdiagnose, der Paraklinik (Leukozytenzahl, Menge CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, prozentuale Angaben zu den Zellpopulationen, die CD4/CD8 Ratio und die LDH), Angaben zum Hautstatus, Lymphknotenstatus, Therapie und die Überlebenszeit seit Diagnosestellung dargestellt.

Für Patient FN, Erstdiagnose März 1999 zeigte sich eine stabile Leukozytenzahl, es kam jedoch vom 29.03.99 zum 07.03.01 zu einer Abnahme der CD3⁺ Zellen auf ein Drittel des Ausgangswertes, der auch in der CD4⁺ Population zu beobachten war. Gleichzeitig nahm die Zahl der CD8⁺ Lymphozyten zu, so dass die CD4/ CD8 Ratio einen starken Abfall von 21 auf 3,7 zeigte. Diese Werte blieben dann im weiteren Verlauf nahezu unverändert. Die LDH zeigte leicht erhöhte Serumlevel mit Werten von 237U/l und 283U/l. Klinisch fand sich eine Erythrodermie und eine diskrete Lymphknotenschwellung. Die Therapie bestand aus einer PUVA-Behandlung, Leukapherese und einer Kombination aus Chlorambucil und Prednisolon. Die Therapie mit Prednisolon und Chlorambucil wurde bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes weitergeführt. Zu diesem Zeitpunkt lebte der Patient 43 Monate seit der Erstdiagnose.

Bei dem Patienten DK, Erstdiagnose 12/96, waren im Beobachtungszeitraum ständig erhöhte Leukozytenzahlen (zwischen 13,82gpt/l und 16,4gpt/l) mit einer abnehmenden Tendenz nachweisbar. Die Zahl der CD3⁺ und CD4⁺ Lymphozyten war erhöht, die Zahl der CD8⁺ unterhalb der Nachweisgrenze, so dass auch hier eine deutlich erhöhte CD4/ CD8 Ratio bestand. Darüber hinaus waren normale bis leicht erhöhte LDH Werte (226U/l, 233U/l, 267U/l) nachweisbar. Der Haut- und Lymphknotenstatus, Erythrodermie sowie axilläre und inguinale Lymphknotenschwellung, blieben unverändert. Die Therapie bestand in einer *extracorporalen Photophorese* (ECP). Der Patient verstarb 63 Monate nach Diagnose Sézary Syndrom an Komplikationen der Erkrankung..

Patient RM, Erstdiagnose 10/99, zeigte im gesamten Beobachtungszeitraum einen stabilen Haut- und Lymphknotenstatus. Der Hautstatus war gekennzeichnet durch eine Erythrodermie mit Pruritus und Hyperkeratosen. Es bestand eine zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenschwellung. Die Leukozytenzahl war immer erhöht und stieg von 17,76gpt/l auf Werte von 35,45gpt/l und 30,48gpt/l an. Es bestand eine erhöhte Zahl CD4⁺ Zellen, die CD8⁺ waren in den letzten zwei Proben nicht nachweisbar. Die LDH war erhöht und zeigte einen

Anstieg von 306U/l über 613U/l auf 769U/l. Therapeutisch wurden Leukapheresen durchgeführt. Der Patient verstarb 23 Monate nach Diagnosestellung.

Für Patienten OS stellt sich ein ähnliches Bild dar. Es wurden stabile Leukozytenzahlen im Normbereich beobachtet, bei einer erhöhten Zahl CD4 positiver Lymphozyten und einer CD4/CD8 Ratio von 13,29 und 19,2. Die LDH war erhöht und lag bei 431U/l bzw. 333U/l. Die Klinik des Patienten, Erythrodermie mit Pruritus und eine generalisierten Lymphknotenschwellung, zeigten einen stabilen Verlauf. Die Therapie bestand anfangs aus Endoxan, Prednisolon, Vincristin und Leukeran und wurde umgestellt auf eine ECP in Kombination mit einer PUVA-Behandlung. Der Patient verstarb 23 Monate nach Diagnosestellung, ein klinisch-pathologischer Zusammenhang zur Erkrankung ist nicht bekannt.

Die Diagnose Sézary Syndrom wurde für Patienten SH im April 1996 gestellt. Es waren im Beobachtungszeitraum normale bis niedrige Leukozytenzahlen, bei erhöhten Werten für CD4⁺ Lymphozyten und einer erhöhten CD4/CD8 Ratio, festzustellen. Die LDH war konstant mit Werten von 242U/l und 241U/l. Die Klinik zeigte eine Erythrodermie mit axillärer, inguinaler Lymphknotenschwellung. Die Therapie bestand aus Leukapheresen, Prednisolon, Leukeran und einer PUVA-Behandlung. Die Überlebenszeit nach Diagnosestellung betrug 43 Monate.

Tab. 20: Klinische und paraklinische Parameter der Patienten.

Pat.	Datum	Leuko Gpt/l	CD3	CD4	CD4 in %	CD8	CD8 in %	Ratio	LDH	ED	Therapie	T/ ÜL*	LK-Status	Hautstatus
RM	11/99	17,76	7,32	7,4	97	0,16	2	46	306	10/99		09/01	LKS, ax bds.	Erythrodermie, Pruritus
	05/00	35,45	-	-	-	-	-	-	613		Leukaph.	(23 Mo)	LKS, cerv, ax, ing	Erythrodermie, palmoplantare Hyperkeratosen
	09/00	30,48	-	-	-	-	-	-	769		Leukaph.		LKS cerv, ax, ing	Erythrodermie
SH	12/98	5,2	4,3	4,2	96	0,18	4	23	242	4/96	Leukaph.	12/99		
	02/99	3,84	2,5	-	-	-	-	-	241		PUVA, Leukaph. Pred., Leukeran	(43 Mo)	LKS ax, ing	Erythrodermie palmo/ plantare Hyperkeratose
DK	11/00	16,4	7,43	7,42	98	0	0	-	226	12/96		03/02	LKS ax, ing	Suberythrodermie
	11/01	14,35	6,29	6,29	98	0	0	-	233		ECP	(63 Mo)	LKS ax, ing	Suberythrodermie
	01/02	13,82	5,98	5,97	98	0	0	-	267				LKS ax, ing	Suberythrodermie
	01/02	13,94	-	-	-	-	-	-					LKS ax, ing	Suberythrodermie
FN	03/99	6,35	1,57	1,52	88	0,07	4	21		03/99		43+ Mo	unauffällig	
	03/01	5	0,71	0,56	66	0,15	18	3,71	237		PUVA , Leukaph. Chlorambucil, Pred.		LKS ax	Erythrodermie Pruritus
	01/02	5,87	1,03	0,82	74	0,21	18	4	-		Chlorambucil, Pred.		unauffällig	Erythrodermie
	03/02	4,95	0,91	0,73	74	0,17	17	4,2	283		Chlorambucil, Pred.		unauffällig	Suberythrodermie
OS	08/00	8,23	1,05	0,98	91	0,07	7	13,29	431	10/98	Endoxan, Pred. Vincristin, Leukeran	09/00	LKS cerv, ax, ing	Erythrodermie Pruritus
	11/00	7,29	1,13	1,09	93	0,06	5	19,20	333		ECP, PUVA	(23 Mo)	LKS cerv, ax, ing	Erythrodermie Pruritus

* → Monat und Jahr des Todes und überlebte Monate seit Diagnosestellung; cerv → zervikal, ax → axillär, ing → inguinal; Pred → Predisolon, Leukaph. → Leukapherese, Leuko → Leukozytenzahl, LDH → Laktat-Dehydrogenase, ED → Erstdiagnosedatum, LK → Lymphknoten, LKS → Lymphkotschwellung, PUVA → Photochemotherapie (8-Mathoxy-psoralen mit UVA), ECP → extracorporale Photophorese

4.4.2 Betrachtung der Daten im Zusammenhang zum klinischen Verlauf

In diesem Abschnitt wird darauf eingegangen, inwieweit sich die in der Quantifizierung und FACS-Analyse gefundenen Veränderungen im klinischen Bild der Patienten widerspiegeln. Bei malignen Tumoren ist ein entscheidendes klinisches Merkmal der Erkrankung die Überlebenszeit. Diese wird auch hinzugezogen zur Bewertung prognostischer Faktoren und Therapieschemata.

Betrachtet man die hier vorliegenden Patientendaten, stellt man fest, dass es in bezug auf die Überlebenszeit drei Gruppen von Patienten gibt: die erste ist die der Patienten, die zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch lebten (FN), die zweite die der Patienten, die fünf Jahre seit Diagnosestellung lebten (DK) und die dritte die der Patienten die kurze Zeit (< 43 Monate) nach der Diagnose Sézary Syndrom verstarben (OS, RM, SH).

Nimmt man die Überlebenszeiten der Patienten als Grundlage und stellt sie den paraklinischen und den hier gefundenen PCR-Analyse- und FACS-Daten gegenüber, ergibt sich folgendes Bild: der Patient FN lebte am Ende des Beobachtungszeitraums 43 Monate. Im Verlauf konnte im Blut eine hohe Ratio $R_{CD7^+/CD7^-}$ und eine niedrige Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ gefunden werden. Das heißt die klonalen Zellen bei FN zeigten eine Dominanz in der $CD7^+$ und $CD26^-$ Population. In der FACS-Analyse zeigte sich ein überwiegend positives Expressionsmuster für CD7 und ein intermediäres Muster für CD26, d.h. FN hatte einen relativ hohen Anteil nicht klonaler $CD26^+$ Zellen. Von allen Patienten zeigte FN die niedrigste CD4/CD8 Ratio. Die weitere klinischen und paraklinischen Parameter zeigten im Verlauf keine entscheidenden Veränderungen. Zu beachten bei der Bewertung der Ergebnisse ist die Expansion einer $CD3^{dim}CD7^-CD26^-$ Zellpopulation.

Patient DK weist eine Überlebenszeit von 63 Monaten auf. Bei allen Proben von DK finden sich die niedrigsten Ratios sowohl für die klonalen $CD7^-$ als auch $CD26^-$ Populationen. Die Dominanz der $CD3^+CD7^-$ und $CD3^+CD26^-$ Zellen konnte in der FACS-Analyse gezeigt werden. Darüber hinaus zeigte DK im Verlauf konstant erhöhte Leukozytenzahlen. Die weitere klinischen Daten zeigten sich auch im Verlauf stabil.

Die Patienten OS, RM und SH gehören zur Gruppe der früh Verstorbenen, sie lebten 23 bzw. 43 Monate nach Diagnosestellung. Für OS, RM und SH konnte anhand der Ratio $R_{CD7^+/CD7^-}$ eine intermediäre Verteilung der klonalen Zellen auf die $CD7^-$ Populationen festgestellt werden. Desweiteren zeigten die klonalen Zellen ein negatives Expressionsmuster für CD26. Die FACS-Analyse ergab ein intermediäres Muster für die $CD7^-$ Population und zeigte das kaum $CD26^+$ Zellen vorhanden waren. Die Patienten OS

Dissertation S. Schöpp

und RM zeigten darüber hinaus die höchsten LDH-Werte und RM zusätzlich noch die höchste Leukozytenzahl aller Patienten. Bei allen Patienten blieb der Hautstatus und der Lymphknotenstatus nahezu unverändert.

Die folgenden zwei Vermutungen lassen sich anhand dieser Daten anstellen:

- I) Patienten, deren Lymphozyten CD26 nicht exprimieren, versterben eher als Patienten mit einem positiven oder intermediärem CD26 Expressionsmuster.
- II) Patienten mit intermediärem CD7 Expressionsmuster in der FACS-Analyse und einer intermediären CD7 Expression der klonalen Zellen versterben ebenfalls eher.

Exakte Aussagen sind jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Patienten, den unterschiedlichen Therapieschemata und dem nur 43monatigem Beobachtungszeitraum von FN nicht möglich.

4.5 Zusätzliche Aspekte der FACS-Analysen

4.5.1 Ungewöhnliche Expressionsmuster von CD7 und CD26 auf peripheren Lymphozyten

In der Analyse der PBMC der Patienten, traten bei fünf Proben Zellpopulationen auf, die den im vorangegangenen Text erwähnten Gruppen nicht zugeordnet werden konnten. Dies war der Fall in den Proben von FN2, FN3, FN4, OS1 und OS2. In diesen Proben waren Populationen vertreten, die einen Verlust von CD7 bzw. CD26 und eine sogenannte „dim“ Expression von CD3 bzw. einen Verlust von CD3 zeigten.

Die Proben von FN zeigten eine stetige Zunahme einer CD3^{dim} Population. In der Probe FN2 deutete sich diese Population an, wurde in der Probe FN3 deutlicher und war dominant in der Probe FN4. Diese CD3^{dim} Population zeigte sowohl einen CD7 als auch einen CD26 Antigen Verlust.

Das Auftreten einer „dim“-Population wurde nur bei FN beobachtet. Um trotz dieses Phänomens die Ergebnisse vergleichbar zu den Ergebnissen der anderen Patienten zu gestalten, wurden die CD3^{dim}/CD3 Zellen nicht in die Analyse einbezogen.

In den Proben von OS konnte eine Population CD3⁻ und gleichzeitig CD7 und CD26 defizienter Zellen nachgewiesen werden. Die Möglichkeit des Verlustes der Pan-T-Zell Marker ist auch in der Literatur beschrieben (Harmon et al. 1996). Mit Hilfe einer PCR mit sortierten Zellen diesen Phänotyps konnte bestätigt werden, dass in dieser Population klonale Zellen vorkommen.

4.5.2 Koexpression von CD7 und CD26 auf peripheren Lymphozyten

Um zu analysieren, wie sich der Antigenverlust von CD7 und CD26 zueinander verhält, wurde eine Doppelfärbung mit CD7 und CD26 durchgeführt. Um die Analyse auf überwiegend Lymphozyten zu beschränken, wurde ein Lymphozytenfenster in der FACS Analyse genutzt, bei dem nur Zellen eingeschlossen wurden, die in Größe und Granularität den Lymphozyten entsprachen. Es wurde jedoch kein Pan-T-Zell Marker verwendet.

Exemplarisch ist eine Graphik der Auswertung der Analyse dargestellt.

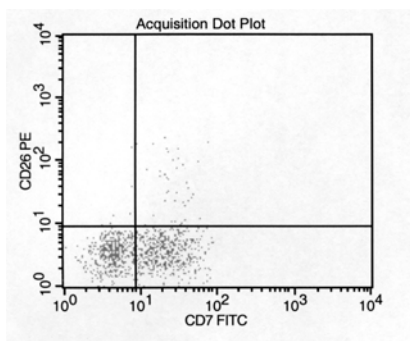


Abb. 11: CD7, CD26 Koexpression der PBMC von RM

Die Verteilung der Lymphozyten auf die einzelnen Populationen ist in der Tabelle 21 dargestellt.

Tab. 21: CD7, CD26 Koexpression der PBMC als prozentualer Anteil der einzelnen Populationen

Probe	CD7 ⁺ CD26 ⁺	CD7 ⁻ CD26 ⁺	CD7 ⁺ CD26 ⁻	CD7 ⁻ CD26 ⁻
DK1	0,8	0,6	0,3	98,3
DK2	0,8	1,1	0,4	97,7
DK3a	0,7	1,6	0,3	97,4
DK3b	0,8	1,6	0,3	97,3
FN1	14,7	1,0	69,2	14,9
FN2	22,4	5,4	45,9	26,3
FN3	12,5	6,2	16,6	64,6
FN4	14,0	3,1	33,1	49,8
RM1	4,8	0,5	47,1	47,6
RM2	0,6	0,4	11,1	88,0
RM3	1,1	0,9	18,0	80,1
OS1	0,5	1,3	43,7	54,5
OS2	5,9	6,3	41,8	46,0
SH2	2,5	1,2	33,6	62,7
∅ Kontrollen	40,1	4,7	32,1	23,1

Die Koexpression von CD7 und CD26 lässt sich gut mit den bisher dargestellten Ergebnissen vereinbaren.

So findet sich bei FN der höchste Anteil $CD7^+CD26^+$ Zellen, der aber mit Werten zwischen 12,5 und 22,4 noch weit unter dem Wert der Kontrollpopulationen (40,1) liegt. Vor allem die $CD7^+CD26^-$ und $CD7^-CD26^-$ Populationen sind erhöht. Da für FN bisher gezeigt wurde, dass die klonalen Zellen sowohl $CD7^+$ als auch $CD7^-$ aber vor allem überwiegend $CD26^-$ sind, liegt die Vermutung nahe, dass die $CD7^+CD26^+$ Zellen bei FN keine maligne entarteten und damit immunkompetente Zellen sind.

Bei DK findet sich, wie erwartet, die überwiegende Zahl der Zellen in der $CD7^-CD26^-$ Population. Auffällig ist der im Vergleich zu den anderen Patienten geringe Anteil $CD7^+CD26^-$ Zellen.

Für die Patienten OS, RM und SH zeigt sich ein sehr geringer Anteil $CD7^+CD26^+$ Zellen jedoch ist der Anteil der $CD7^+CD26^-$ Zellen erhöht, in vier von den sieben Proben sogar höher als bei den Kontrollen. Da gezeigt wurde, dass die klonalen Zellen sowohl $CD7^+$ als auch $CD7^-$ sind und fast alle klonalen Zellen $CD26^-$ sind, handelt es sich bei diesen $CD7^+CD26^-$ und $CD7^-CD26^-$ Zellen sehr wahrscheinlich um überwiegend klonale Zellen.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass bei den Patienten mit schlechterer Prognose (DK, OS, RM, SH), fast alle Zellen auf die $CD7^+CD26^-$ bzw. $CD7^-CD26^-$ Population verteilt sind und bei diesen Patienten der Anteil $CD7^+CD26^+$ Zellen sehr gering ist. Im Unterschied dazu besitzt FN einen relativ hohen Anteil an nicht klonalen $CD7^+CD26^+$ Zellen. Dies würde die These stützen, dass ein hoher Anteil $CD26^+$ Zellen ein prognostisch günstiger Faktor sei.

5 Diskussion

In der Diagnostik und der Verlaufsbeobachtung des Sézary Syndroms kommen zur Zeit eine Vielzahl von Methoden zum Einsatz. Im Vordergrund stehen die klinische Untersuchung, klinische Laborparameter, Histopathologie, Elektronenmikroskopie, zytogenetische Analysen, Immunophänotypisierung und die Immunogenotypisierung als molekularbiologische Methode.

Insbesondere um den Erfolg der Therapie zu evaluieren, haben sich neben der klinischen Untersuchung die Immunophänotypisierung und die Genotypisierung von PBMC bzw. Hautbiopsaten als objektivierbare Parameter erwiesen.

5.1 Methodik

5.1.1 FACS-Analyse und Zellsortierung

Die durchflußzytometrische Analyse von PBMC bei Sézary Syndrom Patienten war Gegenstand vieler Untersuchungen. Die Expression der T-Zell Epitope CD7 und CD26 wurde in den meisten Untersuchungen mit einer Kombination der Färbungen von CD4 und CD7 bzw. CD4 und CD26 monoklonalen Antikörpern analysiert (Novelli et al. 1995, Harmon et al. 1996, Jakob et al. 1996, Dummer et al. 1999, Laetsch et al. 2000, Rappl et al. 2001, Vonderheid et al. 2001, Schwab et al. 2002). T-Zellen exprimieren den T-Zell Marker CD3 in Kombination mit dem T-Zell Epitop CD4 oder CD8. Es konnte gezeigt werden, dass CD3 exprimierende CD8 positive Zellen in den meisten Fällen von Sézary Syndrom Patienten nur bis zu 10% der CD3⁺ Zellen ausmachen, d.h. bei einer klonalen Expansion von CD3⁺CD4⁺ Zellen ist der Anteil der CD3⁺CD8⁺ gering (Vonderheid et al. 2001). Der Verlust des T-Zell Epitops CD4 beim Sézary Syndrom, welches wie beschrieben in den meisten Untersuchungen verwendet wurde, ist mehrfach beobachtet worden. Um diesem möglichen Phänomen Rechnung zu tragen, wurde in unserer Untersuchung die Kombination einer CD3 und einer CD7 bzw. einer CD3 und CD26 Färbung, wie schon von Harmon et al. und Wood et al. beschreiben, gewählt (Wood et al. 1990, Harmon et al. 1996). Mit dieser Färbung erfasst man sowohl die CD4⁺ Zellen, die CD8⁺ Zellen aber auch mögliche CD4⁻ Zellen. Das Auftreten von CD8⁺CD7⁻ Lymphozyten ist beim Sézary Syndrom nicht beobachtet worden, so dass eine Expansion von CD3⁺CD7⁻ Zellen sehr wahrscheinlich auf einer Expansion der CD3⁺CD4⁺CD7⁻ Zellen beruht (Rappl et al. 2001).

Die Analyse der PBMC der Sézary Syndrom Patienten mit CD7 bzw. CD26 Antikörpern ergab ein Muster, bei dem sich die positiven und negativen Populationen nicht eindeutig

voneinander abgrenzten. Das sich in der Analyse darstellende Bild wurde von Jones et al. als *straight line staining pattern* beschrieben (Jones et al. 2001). Dieses Phänomen fanden viele Arbeitsgruppen, die Untersuchungen zur CD7 bzw. CD26 Expression beim Sézary Syndrom durchführten (Bogen et al. 1996, Dummer et al. 1999, Bernengo et al. 2001).

Wood et al. beschrieb 1990, dass CD7-FITC markierte Antikörper nur bis zu 76% der Zellen anfärbten, hingegen PE markierte Antikörper bis zu 97%. Diese Feststellung begründet sich wahrscheinlich in dem damaligen Aufbau der CD7-Antikörper. Als Ursache für das *straight line staining pattern* ist sie nicht heranzuziehen, da das beschriebene Phänomen auch bei der Verwendung von CD7-PE markierten Antikörpern auftritt. Viel wahrscheinlicher ist die Vermutung, dass die unscharfe Abgrenzung der einzelnen Populationen beim Sézary Syndrom in einem allmählichen Verlust der T-Zell Epitope aufgrund einer malignen Transformation und Expansion der Tumorzellen begründet ist bzw. in einer verminderten Stimulation und damit geringerer Expression der Antigene auf den T-Lymphozyten (Harmon et al. 1996).

In der FACS Analyse ließen sich bei den Kontrollbluten alle Populationen sauber getrennt darstellen, ein *straight line staining pattern* war nicht zu beobachten. Aus diesem Grund erfolgte die Festlegung der FACS-Analyse-Gates mit Hilfe von gefärbten und ungefärbten Kontroll-PBMC.

Der Anteil der CD3⁺CD7⁻ Zellen in den PBMC der Kontrollen lag zwischen 12,3% und 8,6% der CD3⁺ Zellen. Angaben aus der Literatur beziehen sich auf die CD4⁺ Population. Hier wird ein Anteil der CD4⁺CD7⁻ Zellen bis zu 10,6% von Bogen et al. und 3-13% von Harmon et al. angegeben (Bogen et al. 1996, Harmon et al. 1996).

Die CD3⁺CD26⁺ Zellen der Kontroll-PBMC hatten einen Anteil von 71% - 80,6% an den CD3⁺ Zellen. Bernengo et al. gibt einen Durchschnittswert für diese Population bei gesunden Probanden von 56,85% an (Bernengo et al. 2001). Andere Autoren nennen für die CD4⁺CD26⁺ Population einen Wert von 77% ± 8% bzw. einen Wert zwischen 87,6% und 98% (Novelli et al. 1995, Jones et al. 2001).

Aufgrund der mechanischen Beanspruchung der Zellen während der Aufbereitung und dem Absterben einiger Zellen während der Lagerung waren in der hier durchgeführten FACS-Analyse avitale Zellen zu beobachten. Da eine Verfälschung der FACS-Ergebnisse denkbar wäre, wurden diese von der Analyse ausgeschlossen. Die vitalen Zellen hatten einen Reinheitsgrad von mehr als 99%. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von Dummer et al., die den Anteil vitaler Zellen an der zu untersuchenden T-Zell Population

Dissertation S. Schöpp

mit 97% angaben (Dummer et al. 1999).

Um die verschiedenen Populationen in den PBMC zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe des CellSorters getrennt. Dabei wurden die Auswahl der Populationen so getroffen, das eine Gewinnung der Zellen mit hohem Reinheitsgrad möglich war. Er betrug für alle Populationen mehr als 99%. Auch hier decken sich die Ergebnisse mit denen von Dummer et al. (Dummer et al. 1999). Die Zellen, die aufgrund ihres Expressionsmusters nicht eindeutig einer Population zuzuordnen waren, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

5.1.2 Entwicklung und Spezifität klonspezifischer Primer

Der eindeutige Nachweis von neoplastischen T-Zell Populationen mit Hilfe durchflußzytometrischer Verfahren ist schwierig, da leicht anwendbare Methoden zum Nachweis von Monoklonalität fehlen (Jones et al. 2001). Zum Nachweis von Monoklonalität bei T-Zell Lymphomen ist der Einsatz einer PCR-Analyse als Standarddiagnostik anerkannt (Weinberg et al. 1995, Willemze et al. 1997, Russel-Jones und Whittaker 1999). Eine solche PCR kann mit Primern, die das TCR- γ -Gen oder das TCR- β -Gen der klonal expandierten T-Zellen amplifizieren, durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Entwicklung von klonspezifischen Primern, die das klonal expandierte TCR-Gen amplifizieren (Volkenandt et al. 1993, Trainor et al. 1996, Fraser-Andrews et al. 2001).

Für die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit war die Identifizierung der klonalen Sequenz notwendig. Aufgrund der limitierten Anzahl von TCR-V γ und TCR-J γ Segmenten und daraus resultierenden einfacheren Methodik wurde zuerst auf Klonalität einer TCR- γ -Sequenz untersucht. Dabei kamen Konsensus-Primer zum Einsatz, die in der Lage sind fast alle möglichen Rearrangements des TCR- γ zu amplifizieren. Darüber hinaus wurde eine PCR zur Bestimmung der klonalen TCR-V β -Sequenz durchgeführt. Hier kamen Primer für das bekannte TCR-V β -Gen und Konsensusprimer für das TCR-J β -Segment zum Einsatz. Ein klonal expandierter T-Zell Tumor stellte sich jeweils als diskrete Bande in der TGGE dar. Diese klonale Bande wurde ausgeschnitten und die DNA zur Sequenzierung extrahiert. Dieses Verfahren der Identifizierung der klonalen Sequenz ist vom Untersucher abhängig, aber in der Literatur anerkannt (Volkenandt et al. 1991, Trainor et al. 1996, Muche et al. 1997). Zur Vermeidung von Fehleinschätzungen, wurde die Bewertung von zwei erfahrenen Wissenschaftlern unabhängig überprüft.

Die auf diese Weise gewonnene Sequenz entspricht dem rearrangierten TCR-Gen eines klonal expandiertem T-Lymphozyten. Diese klonale Sequenz steht nicht automatisch auch

für die Sequenz der malignen Zellen. Da im Blut von Sézary Syndrom Patienten jedoch die malignen T-Lymphozyten alle anderen Lymphozytenpopulationen dominieren ist es sehr wahrscheinlich, dass die gefundene Sequenz auch der Sequenz der malignen Zellen entspricht. Für die hier untersuchten Proben konnte für alle Patienten die TCR- γ -Sequenz und mit Ausnahme von Patient DK auch die TCR- β -Sequenz der malignen Zellen identifiziert werden.

Ist die Sequenz einer klonalen T-Zelle bekannt, kann spezifisch für diese Sequenz ein Primerpaar entwickelt werden, so dass in einer PCR nur die gesuchte Sequenz amplifiziert wird. Entscheidend ist die Entwicklung eines Primers, der an die N-Region des TCR-Gens bindet, da diese für jeden T-Zell-Klon spezifisch ist (s.1.4.4) (Lessin et al. 1991, Volkenandt et al. 1991, Kneba et al. 1994). Dies führt im Vergleich zu einer PCR mit Konsensusprimern zu einer Steigerung der Spezifität und vor allem der Sensitivität (0,1-5% für die Konsensus-PCR vs. 0,0001% für die klonspezifische PCR) (Volkenandt et al. 1993, Muche et al. 1997, Meyer et al. 2001). Für jede ermittelte klonale Sequenz wurde ein Primerpaar, bestehend aus einem TCR-V γ bzw. TCR-V β -Primer und einem Primer für die N-Region, entwickelt und getestet. Das Ergebnis war, dass für DK der klonspezifische Primer der TCR- γ -Sequenz und für FN, OS, RM und SH die klonspezifischen Primer der TCR- β -Sequenz ein spezifisches Ergebnis erbrachten. Für die Spezifität der klonspezifischen PCR ist die Bindung des klonspezifischen Primers an die N-Region von Bedeutung. Insbesondere die Länge der N-Region und deren Basenverhältnis GC : AT spielen eine Rolle, da bei der Ausbildung der drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin mehr Energie frei wird als bei der Bildung der zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenosin und Thymin (Volkenandt et al. 1991, Volkenandt et al. 1993). So führt ein hoher Anteil von Adenin und Thymin zu einer hohen Spezifität der Primer, andererseits sinkt die Annealingtemperatur und damit die Sensitivität. Ein optimales Verhältnis von GC : AT scheint bei über 2 : 1 zu liegen (Volkenandt et al. 1993). Bei den N-Regionen der TCR- γ -Sequenzen für die keine klonspezifische PCR etabliert werden konnte war zum einen die Anzahl der Basen zu gering (FN und RM mit 2 bzw. 4 Basen), zum anderen war das Verhältnis der Basen GC : AT ungünstig (OS 0,66:1, SH 0,6 : 1). Für die klonalen TCR- β -Sequenzen konnte jeweils eine klonspezifische PCR etabliert werden, hier zeigte die N-Region eine ausreichende Basenanzahl (>9) und ein günstiges Verhältnis der Basen GC : AT (>2,5). Zur Kontrolle der Spezifität wurden verschiedene Negativkontrollen (PBMC von Gesunden Probanden, PBMC von Patienten mit anderen Hauterkrankungen, PBMC von Patienten mit Sézary Syndrom und H₂O) für jede etablierte PCR hinzugezogen.

5.1.3 Quantitative PCR

Die Entstehung des PCR-Produktes wird in drei Phasen unterteilt: anfangs befindet sich die PCR in einer s.g. *lag*-Phase, in der das vom PCR-Produkt erzeugte Fluoreszenzsignal kleiner als das s.g. „Hintergrundrauschen“ ist. Anschließend folgt die *log*-Phase, in der die DNA exponentiell vervielfältigt wird bis zum Schluss eine Plateauphase erreicht wird, in der die Menge des PCR-Produkts nicht weiter zunimmt. Von der entstandenen Produktmenge kann auf die eingesetzte DNA-Menge geschlossen werden, falls die Effizienz konstant bleibt. Diese Forderung ist jedoch nur während der *Log*-Phase erfüllt. Beim Übergang in die Plateauphase nimmt die Effizienz ab, eine Quantifizierung ist hier nicht mehr möglich. Die Zahl der Zyklen, nach denen die PCR in die Plateauphase übergeht, ist abhängig von der DNA-Konzentration und der Menge der PCR-Reagenzien. Die Zyklen-Zahl, in denen sich die PCR in der *log*-Phase befindet, wird auf 4-10 Zyklen geschätzt (Jung et al. 2000, Rasmussen 2001).

Zur Abschätzung der eingesetzten DNA-Menge ist die Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel als semiquantitatives Verfahren möglich. Vorteile sind die technische Einfachheit und der geringe Zeitaufwand. Die Nachteile liegen in der niedrigen Validität durch eine hohe Abhängigkeit vom Untersucher. Da die PCR während der Plateauphase beendet wird, ist darüber hinaus die Vergleichbarkeit von zwei Produktmengen nicht möglich. Um die PCR genau in der *log*-Phase zu beenden wären, mehrere PCR-Ansätze mit verschiedener Zyklenzahl notwendig.

Ein anderes Verfahren ist die kompetitive PCR, bei der neben der Proben-DNA eine um Primer und PCR-Reagenzien konkurrierende Standard-DNA eingesetzt wird. Beide DNAs besitzen die gleiche Primerbindungsstelle, können über Unterschiede in der Sequenz oder Länge getrennt werden. Vorausgesetzt, im Ansatz befinden sich gleiche Mengen an Standard- und Proben-DNA, entsteht gleich viel Produkt (Äquivalenzpunkt). In einer Gelelektrophorese erscheinen die Banden dann gleich stark. Das Verhältnis zwischen Proben- und Standard-DNA bleibt auch nach Erreichen der Plateauphase konstant, gleichzeitig steigt die Sensitivität (Powell et al. 1992). Ein Nachteil ist die Notwendigkeit mehrerer PCR-Ansätze mit einer Standardverdünnungsreihe zur Ermittlung des Äquivalenzpunktes beider DNAs und die Weiterverarbeitung mittels Gelelektrophorese. (Reischl et al. 1995).

Eine *real-time PCR* ermöglicht die Messung der Menge doppelsträngiger DNA nach jedem Zyklus. Betrachtet man die *log*-Phase dieser Kurve, kann mit Hilfe eines Standards auf die

Dissertation S. Schöpp

eingesetzte DNA-Menge geschlossen werden.

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde diese Methode angewandt. Sie erweist sich gegenüber der kompetitiven PCR als kostenintensiver, ist jedoch weniger zeitaufwendig, da sie nicht mehrere PCR-Ansätze benötigt. Desweiteren ist eine Weiterverarbeitung des Produkts nach der PCR nicht notwendig, was mögliche Kontaminationen ausschließt (Sarris et al. 2002).

Bei der hier angewandten Methode der LightCycler[®]-PCR kam der Farbstoff SYBRGreen I[®] zum Einsatz. Diese Methode ist etabliert und mehrfach beschrieben worden (Jung et al. 2000, Gutzmer et al. 2001). Ein Nachteil dieser Methode ist von Eckert et al. gezeigt worden. Sie untersuchten mittels TCR- δ -PCR Blutproben von ALL-Patienten und stellten fest, dass der SYBRGreen I[®]-Farbstoff auch an unspezifische PCR-Produkte bindet. In der Negativprobe wurde ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen, das nicht wesentlich niedriger als in den Proben war (Eckert et al. 2000). In der hier durchgeführten Untersuchung wurde mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse die Bindung von SYBRGreen I[®] an unspezifische PCR-Produkte analysiert. Aufgrund einer von der Ziel-DNA unterschiedlichen Länge und Sequenz weisen unspezifische Produkte verschiedene Schmelztemperaturen auf. Die Messtemperatur wurde dementsprechend so gewählt, dass unspezifische PCR-Produkte vernachlässigt werden konnten. In den Negativproben konnte bei keinem der Primer ein signifikantes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden.

Eine Alternative zur SYBRGreen I[®]-Technik ist der Einsatz von Oligonukleotid Hybridisationssonden, dabei kommt es zur Bindung zweier unterschiedlicher mit Fluorescein gelabelter Sonden an der DNA nebeneinander und es entsteht ein sequenzspezifisches Signal (Rasmussen 2001). Eine weitere ist die TaqMan[®]-Probe, bei der ein spezifisches Fluoreszenzsignal durch Abkopplung eines s.g. Quencher, von einer spezifischen Sonde entsteht. (Sarris et al. 2002).

Der Vorteil dieser Methoden liegt in der höheren Spezifität, die mit diesen Alternativen im Vergleich zu SYBRGreen I[®] erreicht werden kann.

Sowohl TaqMan[®]- als auch Hybridisationssonden bestehen aus einer definierten Zahl von Basenpaaren um an einer konservierten TCR-V-Sequenz zu binden. Die N-Region der hier untersuchten DNA bietet mit Längen kleiner als 14 Basen nicht genügend Platz für den Einsatz dieser Sonden. Desweiteren ist die Etablierung dieser Methoden für wenige DNA-Proben hinsichtlich der Entwicklungszeit und der benötigten finanziellen Ressourcen zu aufwendig.

Dissertation S. Schöpp

Als Lösung der dargestellten Problematik hat sich in dieser Arbeit der Einsatz des SYBRGreen I[®] mit erhöhter, an die spezifische PCR angepaßte Meßtemperatur, angeboten.

Für eine zuverlässige Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Gewinnung zuverlässiger Standardverdünnungen wichtig. Die DNA der Standardkonzentrationen wurde aus PCR-Produkten der klonspezifischen PCR gewonnen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine photometrische Messung. Diese Methode ist zur Ermittlung unbekannter DNA-Konzentrationen beschrieben (Dummer et al. 1999).

Mit Hilfe der *Crossingpoints* der Standardverdünnungsreihe ist die Erstellung einer Standardkurve möglich, mit deren Hilfe auf die Konzentration der Proben geschlossen werden kann. Die Validität der Standardkurve wächst mit der eingesetzten Anzahl von Standardverdünnungen. Es musste ein Mittelweg zwischen genügender Validität und ausreichendem Probendurchsatz gefunden werden. Wir setzten deshalb den Standard in vier Zehnerverdünnungsstufen ein (Rasmussen 2001). Wichtig für die Genauigkeit der Quantifizierung ist außerdem der Einsatz von Standard mit in der DNA-Menge ähnlichen Konzentrationen der zu untersuchenden Proben, was mit dem Einsatz der Zehnerverdünnungsstufen zwischen 10^2 und 10^6 bei 5×10^3 DNA-Kopien erfüllt wurde. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde für alle Proben eines Patienten die gleiche Standardkonzentration und gleiche Verdünnungsreihen verwendet. Um die Validität der Quantifizierungsergebnisse zu erhöhen, wurden alle Messwerte zwei- bis vierfach bestimmt. Zu stark abweichende Werte wurden aus der Messung herausgenommen und wiederholt.

Mittels unterschiedlicher Methoden wird der *Crossingpoint* der Amplifikationskurve C_p bestimmt. Hier wurde die *second-derivate-maximum*-Methode verwendet, da sie gegenüber der *fit-point*-Methode untersucherunabhängig ist.

Die DNA der im CellSorter präparierten Zellen wurde extrahiert und für die quantitative PCR aus jeder Probe DNA von 5000 Zellen eingesetzt. Der Einsatz einer definierten Menge an DNA garantierte eine vergleichbare Effizienz der PCR. Beachtet werden muss, dass beim Einsatz geringer DNA-Mengen, die Quantifizierungsergebnisse auch aufgrund statistischer Schwankungen variieren. Die Amplifikation eines Moleküls kann nur in zwei Extremsituationen mit Sicherheit vorausgesagt werden: Beträgt die PCR-Effizienz 1, kommt es zu keiner Amplifikation, beträgt sie 2, kommt es zu einer Verdoppelung der Ausgangs-DNA. Liegt die Effizienz der PCR zwischen 1 und 2, kann nur mit statistischer

Dissertation S. Schöpp

Wahrscheinlichkeit die Amplifikation eines Moleküls vorhergesagt werden. Ist die DNA-Menge groß, kann dies vernachlässigt werden. Die Varianz aufgrund statistischer Überlegungen ist dagegen bei niedrigen DNA-Mengen ausgeprägter. Rasmussen fand bei 10000 Kopien/Ansatz einen Variationskoeffizienten von 6,4%, bei 100 dagegen von 18%. Je niedriger die eingesetzte DNA-Menge, umso größer also das Konfidenzintervall (Rasmussen 2001). Da in dieser Untersuchung 5000 Kopien pro Ansatz eingesetzt wurden, beträgt der Variationskoeffizient ca. 10%, wodurch eine Varianz zumindest teilweise erklärt werden kann.

Eine weitere Ursache für die Varianz der Werte könnte in Pipettierungenauigkeiten liegen. Da die Menge der Ziel-DNA mit 1000 - 3000 Kopien/ μ l klein ist, können geringe Abweichungen der Ausgangs-DNA-Menge bereits große Schwankungen der Produktmenge bewirken.

Vergleicht man die Ergebnisse der qualitativen PCR mit denen der quantitativen PCR so zeigt sich, dass in 15 Patientenproben mit Hilfe der qualitativen PCR und in 14/15 Patientenproben durch die quantitative PCR ein T-Zell-Klon nachgewiesen wird. Um eine Aussage über das Vorhandensein von klonalen T-Zellen zu treffen sind somit beide Methoden als gleichwertig zu betrachten. Eine höhere Nachweisgrenze für die LightCycler[®] PCR mit Schmelzkurvenanalyse konnte hier festgestellt werden. So wurde in 49/50 untersuchten Proben der einzelnen separierten Zellpopulationen T-Zell-Klonalität mit Hilfe der qualitativen PCR und Gelelektrophorese gezeigt. Demgegenüber konnte durch die quantitative PCR in nur 39/50 der gleichen Proben ein T-Zell-Klon gesichert werden.

Dies deckt sich mit bisher veröffentlichten Ergebnissen. So wird die Sensitivität von Pfitzner et al. für eine *real-time PCR* mit 0,002% bis 10,2% angegeben (Pfitzner et al. 2002). Demgegenüber steht die hohe Sensitivität einer qualitativen klonspezifischen PCR mit 1 in 10^5 - 10^6 Zellen (Volkenandt et al. 1993, Muehe et al. 1999). Dieser Unterschied in der Sensitivität könnte die Diskrepanz der Ergebnisse der LightCycler[®]-PCR und qualitativer klonspezifischer PCR bei einigen Patientenproben (FN2, FN3 CD7⁻ und CD26⁺, FN4 CD7⁻ und CD26⁻, OS1 CD26⁺, OS2 CD26⁺, SH1 CD7⁺ und CD26⁺) erklären.

Für die Bewertung der Ergebnisse der quantitativen PCR müssen beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden. Dazu gehört, dass bei der Präparation der DNA aus den im *CellSorter* gewonnenen Zellen es zu einem Verlust von Zellen und damit von DNA kommen kann. Dieser Verlust ist zum einen durch die Adhäsion von Zellen an den

Dissertation S. Schöpp

Präparationsgefäßen und zum anderen durch mehrere Zentrifugationsschritte bedingt. Da die DNA-Konzentration anhand der Zahl präparierter Zellen bestimmt wurde, kann es hier zu einem Fehler in der Quantifizierung kommen. Da das Procedere der Zellpräparation und DNA-Gewinnung alle Proben in gleicher Weise betraf, handelt es sich um einen systematischen Fehler.

Alternativ zu dem beschriebenen Vorgehen, besteht die Möglichkeit, die Konzentration der extrahierten DNA als Berechnungsgrundlage zu bestimmen. Bei dieser Methode stößt man jedoch wieder auf das Problem einer exakten DNA-Quantifizierung. Wie schon beschrieben, steht hierfür die Spektrographie zur Verfügung, doch auch dieses Verfahren ist mit einem nicht zu vernachlässigenden Fehler behaftet.

Um den beschriebenen möglichen Fehlerquellen gerecht zu werden, wurde der relative Anteil der klonalen Zellen an jeder Population bestimmt und zur Auswertung herangezogen. Mit Hilfe dieser Daten war es möglich, die Ratio der klonalen Zellen auf die wahren Verteilungen der Populationen im Blut umzurechnen. Mit der so gewonnenen Ratio kann man Aussagen über die Verteilung der klonalen Zellen auf die einzelnen Populationen und über Veränderungen des Anteils der klonalen Zellen in den Populationen treffen.

Für eine Patientenprobe (FN2) war für keine Population trotz mehrfacher Wiederholung ein Ergebnis in der Quantifizierung zu erzielen.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 CD7 und CD26 Expression beim Sézary Syndrom

Haynes et al. führten 1981 erste durchflußzytometrische Untersuchungen an Zellen von Sézary Syndrom Patienten mit monoklonalen Antikörpern durch und beschrieben den Verlust von T-Zell Epitopen (Hayens et al. 1981). Die Untersuchung von PBMC von Sézary Syndrom Patienten ist inzwischen Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Sterry et al. zeigten, dass die CD4⁺ Zellen in CTCL CD45RA⁻ und CDw29⁺ sind (Sterry und Mielke 1989). Wood et al. beschrieben 1990 den Verlust des T-Zell Antigen CD7 (Wood et al. 1990). Novelli et al. veröffentlichten 1995 Daten, die die verminderte Expression von CD7 und CD26 darstellten (Novelli et al. 1995). Der Verlust von T-Zell Epitopen wurde von Harmon et al. als Indiz für Malignität der betroffenen Zellen gewertet (Harmon et al. 1996). Jakob et al. konnten in ihren Untersuchungen zur Expression der T-Zell Marker CD7, CD45RO, CD45RA und CD25 weitere Abweichungen zur nicht-malignen Zelle zeigen. Weitere Untersuchungen zur CD7 und CD26 Expression wurden von Bogen et al., Dummer et al.,

Dissertation S. Schöpp

Bernengo et al., Scala et al., Laetsch et al., Rappl et al., Vonderheid et al. und Jones et al. veröffentlicht.

5.2.1.1 *CD7 Expression beim Sézary Syndrom*

Die in der Literatur beschriebene Expansion CD7 defizienter T-Zellen war auch Gegenstand unserer Arbeit.

Bei allen hier untersuchten Proben der Sézary Syndrom Patienten zeigten sich gegenüber den Kontrollen ein vermehrter Anteil CD3⁺CD7⁻ Zellen. Diese expandierte CD3⁺CD7⁻ Population hatte Anteile von 13,8 – 99,1%. Unsere Ergebnisse der FACS-Analyse zur CD7 Expression der PBMC gehen mit den Veröffentlichungen anderer Autoren konform. Der Anteil der CD4⁺CD7⁻ Zellen zeigte hier ebenfalls eine große Streuung. Er wird mit 4,9% bis 99% angegeben (Novelli et al. 1995, Harmon et al. 1996, Jakob et al. 1996, Dummer et al. 1999, Laetsch et al. 2000, Rappl et al. 2001, Vonderheid et al. 2001, Schwab et al. 2002). Der Verlust des Antigen CD7 beim Sézary Syndrom ist zwar als mögliches Phänomen der Erkrankung anerkannt, es stellt trotzdem kein konstantes Merkmal von Sézary-Zellen dar. Bernengo et al. beschrieben CD7⁺ Sézary-Zellen in 21/53 Fällen.

Im Blut der hier untersuchten gesunden Kontrollen lag der Anteil der CD3⁺CD7⁻ Zellen im Durchschnitt unter 10,0%. In der Literatur wird ein Wert von 9% +/- 3,4% angegeben (Reinhold et al. 1993).

Im Verlauf zeigten die meisten Patienten einen stabilen Anteil an CD3⁺CD7⁻ Zellen. So hatten DK, OS und SH nur Schwankungen von unter 8,5% aufzuweisen. Bei FN zeigte sich im Verlauf ein Zu- und Abnehmen der CD7⁻ Population (initial 13,8% Anstieg auf 40,0% Abfall auf 14,0% und erneuter Anstieg auf 23,4%). RM zeigte die größten intraindividuellen Schwankungen. Hier kam es zu einem Anstieg der CD7⁻ Population von 43,1% vom initialen Wert 46,5% und in der nächsten Probe wieder zu einem Absinken des Anteils um 16,5%. Andere Untersuchungen zur Entwicklung der CD7 Zellen im Verlauf sind bisher nicht veröffentlicht.

Der Anteil der CD3⁺CD7⁻ Zellen im Blut der Patienten erlaubt eine Einteilung in drei Gruppen, die Grenzen wurden bei über 70% CD7⁺ für ein überwiegend positives Expressionsmuster, unter 10% CD7⁺ für ein überwiegend CD7⁻ Muster und ein intermediäres Muster zwischen diesen Grenzen festgelegt. Es stellte sich zum einen eine Gruppe (Patient DK) mit überwiegend CD7⁻ Zellen dar, zum anderen eine Gruppe (Patienten OS, RM, SH) mit einem intermediären Expressionsmuster für CD7 und eine

Gruppe (Patient FN) mit einem überwiegend positiven Muster der CD7-Expression. Diese Einteilung wurde vorgenommen um später eventuelle Zusammenhänge zu klinischen oder prognostischen Faktoren aufzuzeigen. Eine derartige Unterteilung entsprechend dem Auftreten von CD7⁻ Zellen im Blut von Sézary Syndrom Patienten wurde auch schon von anderen Autoren durchgeführt. Wood et al. definierten auf Grundlage ihrer Untersuchung ebenfalls drei Gruppen. Die erste mit einer Grenze von 10% CD7⁺ Zellen enthielt einen Patienten, die zweite mit den Grenzen 20% und 40% als unterer bzw. obere Grenze enthielt 2 Patienten und die letzte Gruppe, mit mehr als 50% CD7⁺ Zellen, beinhaltete 13 Patienten (Wood et al. 1990). Jakob et al. stellten eine Einteilung für CTCL in 4 Stadien vor. Ein Stadium III und IV ihrer Einteilung, welche die Entität Sézary Syndrom beinhalten, sollte mit einem Anteil von CD4⁺CD7⁻ von 70,9% +/- 26,9% einhergehen (Jakob et al. 1996). Vonderheid et al. definierten zwei Kohorten. Eine repräsentierte 19/42 Patienten mit überwiegend CD7⁺ Lymphozyten und die andere Kohorte, enthält 23/42 Patienten mit überwiegend CD7⁻ Zellen. Die Grenze zwischen beiden Kohorten wurde bei 50% der jeweiligen Population festgelegt (Vonderheid et al. 2001). Problematisch bei allen bisher beschriebenen Einteilungen ist die geringe Anzahl von Patienten (Wood et al. 1990), die fehlende Unterscheidung der CTCL-Entitäten (Wood et al. 1990, Jakob et al. 1996) und nach welchen Kriterien die Expressionsmuster der Zellen abgegrenzt werden sollen. Die in dieser Arbeit vorgenommene Einteilung beinhaltet demgegenüber nur Sézary Syndrom Patienten und die Grenzen sind so gewählt, um differenziert die Patienten beurteilen zu können. Ein Nachteil, der in der niedrigen Inzidenz der Erkrankung begründet liegt, ist auch die in dieser Beobachtung kleine Fallzahl.

5.2.1.2 CD26 Expression beim Sézary Syndrom

Bisher sind nur wenige Untersuchungen zur Expression des T-Zell Epitops CD26 beim Sézary Syndrom veröffentlicht worden. Die variable Expression dieses Antigens bei malignen Entartungen der T-Zell Reihe ist beschrieben. Es zeigte sich dabei eine vermehrte aber auch eine verminderte Expression von CD26 auf den PBMC im Vergleich zu PBMC gesunder Probanden (Verstovsek et al. 2000).

Auch in unserer Untersuchung wurden T-Zellen auf ihre CD26-Expression untersucht. In allen Proben der hier Untersuchten Patienten konnte eine Expansion der CD3⁺CD26⁻ T-Zell Populationen gezeigt werden. Dies geht konform mit bisherigen Betrachtungen im Zusammenhang mit dem Sézary Syndrom bei denen eine verminderte Expression von

Dissertation S. Schöpp

CD26 auf CD4⁺ Zellen und eine Expansion der CD4⁺CD26⁻ Lymphozyten gezeigt wurden (Novelli et al. 1995, Bernengo et al. 1998, Bernengo et al. 2001, Jones et al. 2001, Rappl et al. 2001). Darüber hinaus beschreibt Bernengo et al. eine positive Korrelation der Expansion der CD4⁺CD26⁻ und der Zahl der im Blut vorhandenen Sézary-Zellen.

Für die von uns durchgeführte Untersuchung der CD26 Expression an gesunden Kontrollen wurde ein durchschnittlicher Anteil CD3⁺CD26⁻ Zellen von 23,3% gefunden. Dieser Wert deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Wert von 14% - 44% (Bernengo et al. 2001, Jones et al. 2001).

Für die Proben der Patienten betrug der Anteil der CD3⁺CD26⁻ Lymphozyten zwischen 42,3% bis 99,4%, wobei der Median bei 96,8% lag. Die Angaben anderer Autoren nennen einen Anteil der CD4⁺CD26⁻ Zellen von 58,7% +/- 26,9% bzw. 76,5% +/- 3,4% (Novelli et al. 1995, Bernengo et al. 2001). Rappl et al. beschrieben weniger als 5% CD26⁺ in einer expandierten V β Population (Rappl et al. 2001). Der Verlust des T-Zell Epitops CD26 auf den PBMC von Sézary Syndrom Patienten konnte somit bestätigt werden und scheint ein konstantes Merkmal bei dieser Erkrankung zu sein.

In Analogie zur Untersuchung der CD7 Expression erfolgte auch für die CD26-Expression eine Einteilung entsprechend des Expressionsmusters. Eine Gruppierung entsprechend dem Anteil CD26⁻ Zellen an den Lymphozyten ist bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine solche Einteilung vorgenommen, um mögliche Ähnlichkeiten zur CD7 Expression feststellen zu können und um eine Korrelation der CD26 Expression zur Klinik auswerten zu können.

Es wurde eine Gruppe mit überwiegend CD26⁻ PBMC (mehr als 90% CD3⁺CD26⁻ Zellen) definiert, zu dieser Gruppe gehören vier Patienten (DK, OS, RM, SH). Die zweite Gruppe enthielt Patienten mit einem intermediären Expressionsmuster für CD26 (Anteil der CD3⁺CD26⁻ Zellen zwischen 30% und 90%). Ihr konnte Patient FN zugeordnet werden. Die dritte Gruppe mit überwiegend CD26⁺ Lymphozyten (weniger als 30% CD3⁺CD26⁻) beinhaltete nur die gesunden Kontrollen.

5.2.1.3 CD7, CD26 Koexpression beim Sézary Syndrom

Eine weitere in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung galt der Koexpression der T-Zell Epitope CD7 und CD26. Bisher publizierte Arbeiten stellten nur getrennte Untersuchungen zu beiden T-Zell Antigenen an. Dort wurde der Verlust jeweils eines der beiden Antigene auf den PBMC beschrieben. Der Verlust wurde für jedes Antigen an sich als Zeichen von

Malignität und damit als Marker für die Tumorzellen bewertet.

Für die gesunden Kontrollen ergab sich ein hoher Anteil doppelt-positiver Zellen (40,1%), ca. ein Drittel der Zellen waren $CD7^+CD26^-$, etwa ein Viertel der Zellen zeigte einen doppelnegativen Phänotyp. Es fand sich nur ein geringer Anteil $CD7^-CD26^+$ Zellen.

Auffallend ist bei allen hier untersuchten Patienten, der verringerte Anteil $CD7^+CD26^+$ Zellen, wobei ein Patient (FN) mit durchschnittlich 16% den höchsten Anteil aufwies. Die übrigen Patienten zeigten einen Anteil von weniger als 6%. Die Zellpopulationen der $CD7^+CD26^-$ und $CD7^-CD26^-$ Zellen zeigten entsprechend, und auch im Vergleich zu den vorausgegangenen Untersuchungen, einen erhöhten Anteil. Allein der Anteil der $CD7^-CD26^+$ positiven Zellen war sowohl für die Kontrollen als auch für die Patienten gering (unter 6,3%).

In zwei Veröffentlichungen ist bisher auf die Koexpression von CD7 und CD26 eingegangen worden. Novelli et al. beschreiben den Anteil der $CD4^+CD7^-CD26^-$ Zellen in den Proben ihrer Patienten mit 23% - 78% Median bei 35,5% (Novelli et al. 1995). Bernengo et al. zeigten, dass $CD4^+CD26^-$ auch defizient für CD7 sein können. Dabei variierte der Anteil der $CD7^-$ in dieser $CD4^+/CD26^-$ Population von 10% bis 90% (Bernengo et al. 2001). Diese Ergebnisse bestätigen die hier gemachten Beobachtung einer verringerten $CD7^+CD26^+$ Population und einer vergrößerten doppelnegativen Population bei Patienten mit Sézary Syndrom.

5.2.2 Präsenz des T-Zell-Klons in den $CD7^+$, $CD7^-$ und $CD26^+$, $CD26^-$ Populationen

Die eindeutige Identifizierung und Charakterisierung der Tumorzellen beim Sézary Syndrom ist Gegenstand vieler Arbeiten gewesen. Die von Lutzner et al. anhand der Morphologie identifizierten Zellen, s.g. Sézary-Zellen, galten lange als die maligne entarteten Zellen (Lutzner und Jordan 1968). In verschiedenen späteren Untersuchungen wurde diese Annahme widerlegt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Sézary-Zellen einen klonalen Ursprung haben. Die Zahl der Sézary-Zellen kann darüber hinaus von der Zahl der tatsächlich klonal expandierten Zellen übertroffen werden (Weinberg et al. 1995, Bogen et al. 1996, Bernengo et al. 1998, Rappl et al. 2001). Da also die Morphologie der PBMC allein nicht die Tumorzellen identifiziert, kann man die Tatsache nutzen, dass T-Zellen klonalen Ursprungs einen identischen T-Zell-Rezeptor rearrangieren und exprimieren. Die Tumorzellen lassen sich deshalb anhand des T-Zell-Rezeptors sowohl auf molekularbiologischer als auch auf immunophänotypischer Ebene nachweisen. Da der Verlust der T-Zell Epitope CD7 und CD26 als Merkmal der Tumorzellen diskutiert wird,

Dissertation S. Schöpp

wurde eine Charakterisierung der Tumorzellen anhand von Klonalitätsmerkmalen und Oberflächenantigenmerkmalen angestrebt. Hierzu sind zwei Ansätze verfolgt worden. Zum einen die reine immunphänotypische Darstellung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern in einer FACS-Analyse und zum anderen die Kombination von durchflußzytometrischen Analysen mit PCR-Analysen. Für den exakten Nachweis von Tumorzellen in der PCR-Analyse bietet sich der Einsatz von klon-spezifischen Primern an. In der hier vorliegenden Arbeit wurden PBMC nach einer FACS-Analyse entsprechend ihrer Oberflächenmerkmale für CD7 und CD26 mit Hilfe des CellSorters sortiert und die Tumorzellen durch einen qualitativen und einen quantitativen PCR-Assay, unter Verwendung von klon-spezifischen Primern, nachgewiesen.

Durch diese Herangehensweise, konnte zum erstenmal sicher gezeigt werden, dass Tumorzellen ein und desselben Sézary Syndrom Patienten sowohl CD7 bzw. CD26 exprimieren, als auch defizient für diese T-Zell Epitope sein können. Der entsprechende T-Zell-Klon konnte mit Hilfe der PCR-Analyse unter Verwendung klon-spezifischer Primer in 11/15 Proben für die CD3⁺/ CD7⁺ Population, in allen 15 Proben der CD3⁺CD7⁻ Population, in 8/15 Proben der CD3⁺CD26⁺ Zellen und in allen 15 Proben der CD3⁺CD26⁻ Lymphozyten gezeigt werden.

Im Gegensatz zu unserer Methode des Klonalitätsnachweises durch eine PCR-Analyse, wurde von vielen Arbeitsgruppen lediglich eine immunphänotypische Charakterisierung der Tumorzellen vorgenommen. Wood et al. stellten anhand der Ergebnisse eines solchen Vorgehens die Hypothese auf, dass die CD7⁻ Population Tumorzellen enthält (Wood et al. 1990). Rappl et al. beobachteten, dass TCR-Vβtm⁺ T-Zellen (TCR-Vβtm⁺ steht für das Vβ, welches von der expandierten Zellpopulation exprimiert wird) kein CD7 exprimierten (Rappl et al. 2001). Dies kann mit unseren Beobachtungen bestätigt werden, da auch hier klonale T-Zellen in der CD3⁺CD7⁻ Population gezeigt werden konnten. Die Frage, ob die Tumorzellen ausschließlich negativ für CD7 sind, wie von Laetsch et al. angenommen (Laetsch et al. 2000), ist damit noch nicht geklärt. In unseren Untersuchungen konnte sowohl in der CD7⁺ als auch in der CD7⁻ Population ein klonales TCR-γ Rearrangement nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde hier eine Untersuchung mit klon-spezifischen Primern durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei den klonal expandierten Zellen tatsächlich um ein und denselben Klon handelt. Dies ist somit der Beweis dafür, dass die Tumorzellen beim Sézary Syndrom sowohl CD7 exprimieren als auch defizient sein können. Die hier gemachte Untersuchung untermauert damit von

Dissertation S. Schöpp

anderen Autoren gemachte Beobachtungen. So berichteten Vonderheid et al., dass CD7 nicht von allen TCR-V β tm⁺ Zellen exprimiert wird (Vonderheid et al. 2001). Weitere Untersuchungen von Dummer et al. zeigten ebenfalls, dass TCR-V β tm⁺ T-Zellen nicht nur CD7⁻ sondern auch CD7⁺ sein können, wobei der Anteil der CD7⁺ mit 35% kleiner als der der CD7⁻ Zellen sei. Eine PCR-Analyse beider Populationen zeigte Klonalität für ein TCR- γ Rearrangement in beiden Gruppen (Dummer et al. 1999). Problematisch bei dem alleinigen Nachweis eines klonalen Rearrangements ist, dass dies kein Beweis für einen identischen Klon in den einzelnen Populationen ist. Dies konnte erstmals durch den Einsatz der klonspezifischen Primer unserer Untersuchung gezeigt werden.

Obwohl der Verlust des T-Zell Epitops CD26 auf den PBMC beim Sézary Syndrom als Merkmal anerkannt ist, sind Untersuchungen zum möglichen klonalen Ursprungs dieser Zellen bisher nicht angestellt worden. Die hier durchgeführten Analysen mit Hilfe der klon-spezifischen PCR wiesen klonale Zellen sowohl in der CD26⁺ als auch in der CD26⁻ Population nach. Dies bestätigt die veröffentlichten Ergebnisse, von Bernengo et al. und Rappl et al., die mit Hilfe immunophänotypischer Analysen zeigten, dass TCR-V β tm⁺ T-Zellen defizient für CD26 sein können (Bernengo et al. 2001, Rappl et al. 2001).

Unsere Daten zeigen somit, dass beim Sézary Syndrom der genetisch definierte Tumorzellklon unterschiedliche Phänotypen zeigen kann, nämlich CD3⁺CD7⁺, CD3⁺CD7⁻, CD3⁺CD26⁺ und CD3⁺CD26⁻.

Die sich anschließende Fragestellung, nach der Verteilung der Tumorzellen auf die einzelnen Populationen und eines dominanten Phänotyps wurde in dieser hier vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Es wurde eine quantitative PCR-Analyse, eine s.g. *real-time-PCR*, durchgeführt und die Verteilung der klonalen Zellen auf die einzelnen Populationen anhand einer Ratio von CD positiven zu CD negativen dargestellt.

Für die CD7 Expression zeigte sich, dass die Verteilung der klonalen Zellen eine Einteilung in drei Gruppen ermöglichte: zum einen die Gruppe (Patient DK) mit einer niedrigen Ratio (<0,0001) und überwiegend CD7⁻ klonalen Zellen, zum anderen die Gruppe (Patienten OS, RM, SH) mit einer Verteilung der klonalen Zellen auf beide CD7- Populationen (Ratio zwischen 0,12 und 1,4) und eine Gruppe (Patient FN) mit einer Dominanz von CD7⁺ (Ratio > 52,16) in der klonalen Population.

Bisher veröffentlichte Daten basierten auf durchflußzytometrischen Untersuchungen, die zeigen, dass alle TCR-V β ⁺ Zellen, also entsprechend den hier nachgewiesenen klonalen Zellen, einen Anteil von 15% -96% an der Gesamtzahl der PBMC haben können (Dummer et

al. 1999, Fraser-Andrews et al. 2001, Rappl et al. 2001). Dies spricht für einen sehr variablen Anteil von Tumorzellen an den PBMC. Die Verteilung der Tumorzellen auf die Populationen der CD7 exprimierenden bzw. defizienten Zellen wurde unterschiedlich angegeben. Zum einen berichteten Rappl et al., dass über 98% der TCR-V β tm⁺ Zellen negativ für CD7 seien (Rappl et al. 2001), zum anderen zeigten Dummer et al., dass bis zu 35% der TCR-V β tm⁺ Zellen noch CD7 exprimieren können (Dummer et al. 1990). Diese variable Verteilung der klonalen Zellen konnte von uns bestätigt werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen auch, weshalb der alleinige Nachweis von CD7⁻ Zellen kein Rückschluss auf die Tumorlast erlaubt (vgl. Laetsch et al. 2000).

Hinsichtlich der CD26 Expression zeigte die Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ von unter 0,04 für alle Patienten, dass die klonalen Zellen fast ausschließlich auf die CD26⁻ Population verteilt waren. D.h. bei allen hier untersuchten Sézary Syndrom Patienten waren die Tumorzellen defizient für CD26. Bestätigung findet sich in den Beobachtungen von Bernengo et al. und Rappl et al., die mit Hilfe immunophänotypischer Analysen zeigten, dass 95% der TCR-V β tm⁺ T-Zellen kein CD26 exprimieren (Bernengo et al. 2001, Rappl et al. 2001).

Aus den von uns gefundenen Ergebnissen zur Verteilung der klonalen Zellen auf die CD7 und CD26 Populationen, lassen sich für die Tumorzellen beim Sézary Syndrom folgende dominante Phänotypen beschreiben: zum einen der Phänotyp einer CD3⁺CD7⁺CD26⁻ Tumorzelle zum anderen einer CD3⁺CD7⁻CD26⁻ Tumorzelle. Diese Phänotypisierung der Tumorzelle kann als gesichert gelten, da für alle Populationen mit Hilfe der klonalspezifischen PCR-Analyse der klonale Ursprung der Zellen nachgewiesen wurde. Desweiteren war festzustellen, dass sich für die klonalen Zellen eine Gruppierung in drei Gruppen, negativ, intermediär und positiv für CD7, vornehmen ließ.

Das von uns angewendete Verfahren zum Nachweis klonaler Zellen in den CD7 und CD26 Populationen ist bisher nicht beschrieben worden. Bisherige Untersuchungen stützten sich überwiegend auf durchflußzytometrische Analysen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen die V β -Kette des T-Zell-Rezeptors eine gute Annäherung an die Menge von klonal expandierten Zellen möglich ist (Bogen et al. 1996). Weiterhin gehören durchflußzytometrische Untersuchungen heute zur Routinediagnostik und sind damit vielfach verfügbar. Die Methodik ist schnell und einfach anwendbar. Trotz aller Vorteile, hat diese Methode vor allem für den Nachweis klonaler Zellen auch Nachteile. Da ein Antikörper gegen ein TCR-V β nur T-Zellen, die mindestens einen Anteil von 1% -5% der physiologischen T-Zellen ausmachen, können kleine

Tumorpopulationen, z.B. in Form von minimalen Resterkrankungen, unerkant bleiben (Bogen et al. 1996). Ein weiterer Punkt ist, dass mit einem TCR-V β identifizierte Populationen auch immer nicht klonale Zellen in wechselndem Ausmaß enthalten. Darüber hinaus sind nicht für jedes mögliche rearrangierte TCR-V β Antikörper verfügbar. So konnte bei Dummer et al. nur in 3/8 Patienten der Klon anhand des TCR-V β identifiziert werden (Dummer et al. 1999). Problematisch ist weiterhin, dass diese Antikörper inkonstant oder mit geringerer Affinität reagieren können. Die Ursachen dafür liegen in Unterschieden im JC-Bereich des T-Zell-Rezeptors und der rearrangierten N-Region. Diese Faktoren können die ursprüngliche Affinität des Antikörpers auf 1/10 reduzieren. Diese Phänome sollte vor allem vor dem Hintergrund beachtet werden, dass die zu untersuchenden Zellen maligne entartet sind und somit veränderte Oberflächenmerkmale, auch im TCR, aufweisen können (Bigler et al. 1996). Die Schwankungsbreite des Anteils der klonal expandierten Zellen stellt für die Identifizierung des Klons mit Hilfe monoklonaler Antikörper ein Problem dar. In einer Untersuchung eines anderen Typs von einem T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom wurde gezeigt, dass zur Identifizierung des Klons mittels Antikörper gegen die TCR-V β -Kette eine V β Expansion von über 60% der PMC nötig war, um eine Sensitivität von 81% bei einer Spezifität von 100% zu erreichen (Vonderheid et al. 2002).

Durch die in unserer Arbeit durchgeführte Analyse der Klonalität mit Hilfe eines PCR-Assays, wurden die eben genannten Probleme umgangen. Hier erfolgte der Nachweis molekulargenetisch und unabhängig vom Phänotyp der Zellen. Nachteilig an dieser Vorgehensweise ist der hohe methodische Aufwand und die Gefahr der Kontamination der Proben. Da die PCR-Analyse eine hohe Sensitivität hat, können geringe Mengen DNA von Zellen oder PCR-Produkten des gleichen Patienten zu falsch positiven Ergebnissen führen. Das Problem der Kontamination von Proben wurde durch einen sorgfältigen Umgang mit der DNA in speziell dafür eingerichteten Laboren minimiert.

5.2.3 Korrelation der FACS-Daten und der Daten der Quantifizierung

Bisher wurde in den verschiedenen Arbeiten versucht, mit Hilfe der FACS-Analyse ein Verfahren für die Beobachtung der Therapie und Einschätzung der Prognose zu etablieren (Dummer et al. 1999, Bogen et al. 1996, Harmon et al. 1996, Rappl et al. 2001, Schwab et al. 2002). Problematisch ist bei der alleinigen Anwendung der FACS-Analyse der bisher fehlende exakte Nachweis der klonalen Zellen, d.h. der Tumorzellen, gewesen. Mit Hilfe der

Quantifizierung und der Ermittlung der Ratio konnte die Verteilung der Tumorzellen auf die einzelnen Populationen gezeigt werden. Der Nachteil dieser Methode ist der erhebliche Zeit- und Materialaufwand.

Stellt man die Ergebnisse der quantitativen PCR-Analyse mit denen der FACS-Analyse gegenüber, so zeigt sich, dass in 23/30 Proben die Tumorzellen auch auf die, prozentual gesehen, dominante CD7 bzw. CD26 Population in der FACS-Analyse verteilt sind. Für die verbleibenden sieben Proben stellt es sich wie folgt dar: drei Proben (SH1_{CD7}, FN1_{CD26}, FN3_{CD26}) zeigten eine Tumorzellpopulation in der ein Expressionsmuster der Oberflächenantigene dominierte, in der FACS-Analyse stellte sich jedoch ein intermediäres Verteilungsmuster dar. Für drei Proben (FN2_{CD7}, FN2_{CD26}, SH1_{CD26}) war kein Ergebnis in der LighCycler[®]-PCR zu gewinnen und für die Probe FN_{CD26} ist zu beachten, dass hier eine dominante CD3^{dim}/ CD26⁻ Population auftrat. Hier waren nur wenige Tumorzellen in der CD3⁺CD26⁻ Population vorhanden. Damit kann R_{CD26⁺/CD26⁻} für diese Probe nicht bewertet werden. Für die Proben FN1 und FN3 bedeutet das Ergebnis, dass in diesen Proben viele nicht klonale CD26⁺ Zellen vorhanden waren. Das Ergebnis von SH1 ist eher als Ausreißer zu bewerten, da hier innerhalb kurzer Zeit die Tumorzellen vermehrt CD7 exprimieren müssten um das Ergebnis von SH2 zu erreichen. Eine derartige Progression erscheint unwahrscheinlich und wurde auch in der Literatur nicht beschrieben.

Die Abschätzung der Tumorlast allein anhand der FACS-Analyse der CD7 exprimierenden Zellen ist nicht ausreichend, hier ist eine Klonalitätsanalyse der Populationen, insbesondere der CD7⁺ Populationen zu fordern. Damit ist die Vermutung von Wood et al., Laetsch et al. und Rappl et al. widerlegt, dass die Tumorzellen allein von den CD7⁻ Zellen repräsentiert werden (Wood et al. 1990, Laetsch et al. 2000, Rappl et al. 2001). Zusätzlich zu dieser Arbeit wurde in den Veröffentlichungen von Bogen et al., Dummer et al. und Vonderheid et al. gezeigt, dass die Tumorzellen auch den Phänotyp einer CD7⁺ Zelle annehmen können (Bogen et al. 1996, Dummer et al. 1999, Vonderheid et al. 2001). Damit ist eine Abschätzung der Tumorlast allein aufgrund der CD7 Expression nicht möglich, da auch vermeintlich "normale" CD3⁺CD7⁺ Zellen in erheblichem Ausmaß Tumorzellen darstellen können (s. Patient FN).

Die Analyse der CD26 Populationen beim Sézary Syndrom könnte eine Möglichkeit der schnellen Abschätzung der Tumorlast darstellen. Wie in dieser Arbeit vorgestellt und auch von Bernengo et al. angedeutet, stellt der überwiegende Teil der CD3⁺CD26⁻ Zellen die

Tumorzellen dar. In 12/13 Proben waren die Tumorzellen auf die CD26⁻ Population verteilt. Bestätigt sich dieses Phänomen auch bei größeren Patientenkollektiven mit der Diagnose Sézary Syndrom, bestünde hier die Möglichkeit, mit einer FACS-Analyse der CD3⁺CD26⁻ Zellen einen schnellen Überblick über die Tumorlast im Blut der Patienten zu erhalten und damit eventuell die Möglichkeit eines objektiven Monitorings der Erkrankung.

5.2.4 dim-Expression von CD3

Das Phänomen des Verlustes von T-Zell Antigenen beim Sézary Syndrom ist in den vorangegangenen Kapiteln schon beschrieben worden. Gelegentlich kommt es jedoch vor, dass ein T-Zell Antigen von den Tumorzellen noch synthetisiert und exprimiert wird, die Dichte dieses Antigens auf der Oberfläche der Zelle jedoch geringer ist als auf „gesunden“ Lymphozyten. Dieses Phänomen der *dim* Expression eines Antigen ist auch für das Sézary Syndrom beschrieben worden. Es wurde für die T-Zell Epitope CD3, CD4, CD7 und CD26 beobachtet (Bogen et al. 1996, Dummer et al. 1999, Jones et al. 2001). Dummer et al. beschrieben eine CD3*dim* Population in der Gruppe der TCR-Vβtm⁺ Zellen. Eine CD3*dim*-Population wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. In den PBMC von FN wurde eine CD3*dim* Population in allen vier untersuchten Proben nachgewiesen. Diese CD3*dim* Population war überwiegend defizient für CD26. Im Verlauf kam es zu einer stetigen Zunahme dieser CD3*dim*CD26⁻ Population, so dass sie in der letzten Probe, FN4, die anderen Populationen dominierte. Die Möglichkeit eines Fehlers in der Methodik ist unwahrscheinlich, da die Färbung der Kontroll-PBMC sich wie erwartet darstellte. Problematisch stellte sich die Auswahl der zu sortierenden Populationen dar. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde diese *dim*-Population gesondert untersucht. Mit Hilfe der klon-spezifischen PCR für FN konnte gezeigt werden, dass sich in dieser *dim*-Population derselbe Klon, der auch in den anderen Populationen zu finden war, darstellte.

Das Auftreten dieser CD3*dim* Population ist bei der Auswertung insbesondere der FACS-Analysen und der quantitativen PCR-Analysen zu beachten. Für die Auswertung der FACS-Analyse ergibt sich deshalb für die Proben FN3 und FN4 anstelle des intermediären Expressionsmusters für CD26 ein überwiegend negatives Expressionsmuster. In der quantitativen PCR-Analyse der Proben FN1 und FN3 konnten die Tumorzellen noch überwiegend in der CD3⁺CD26⁻ Population nachgewiesen werden. In der Probe FN4 war dies nicht mehr möglich, so dass sich hier eine Umkehr der Ratio $R_{CD26^+/CD26^-}$ von 0,0005 zu >162 darstellte. In Anbetracht der dominanten CD3*dim* CD26⁻ Population, die wie

Dissertation S. Schöpp

schon erwähnt ebenfalls Tumorzellen enthielt, ist das Ergebnis der Quantifizierung der Probe FN4 gesondert zu bewerten. Hier liegt die Vermutung nahe, dass der Tumorzellklon einen CD3^{dim} CD26⁻ Phänotyp exprimiert.

5.3 Prognostische und diagnostische Relevanz der Ergebnisse zur Tumorlast, CD7 Expression, CD26 Expression in Bezug zur Klinik und Therapie

Das Sézary Syndrom hat eine fünf Jahres Überlebensrate von 11% - 33% (Willemze et al. 1997, Bernengo et al. 1998). Möglichkeiten, die Ansprechrate auf eine Therapie zu objektivieren, ein s.g. Therapie-Monitoring durchzuführen und Aussagen zur Prognose zu treffen, sind begrenzt (Wieselthier et al. 1990). Es wurde in mehreren Arbeiten versucht ein System zum Staging der Patienten und Parameter zur Therapieüberwachung und Prognoseeinschätzung zu etablieren. Bisher konnte sich kein Ansatz durchsetzen (Bernengo et al. 1998, Fraser-Andrews et al. 2001, Jones et al. 2001, Scarisbrick et al. 2001).

5.3.1 CD7 und CD 26 Expression in Korrelation zu klinischem Status und Therapie

Bei allen hier untersuchten Sézary Syndrom Patienten konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen im Blut einen weitgehend konstanten Phänotyp zeigten. Der klinische Status zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, weder starke Progression noch Remissionen.

Um die bisherigen Therapieschemata und Verlaufparameter besser beurteilen zu können, wurde in dieser Untersuchung eine Einteilung vorgenommen, die den dominanten Phänotyp der Tumorzellen als Grundlage hat. Für alle Patienten zeigte sich ein dominanter, konstant CD26⁻ T-Zell-Klon. Anhand der CD7-Expression der Tumorzellen konnte eine Einteilung der Patienten in drei Gruppen erfolgen. Die Tumorzellen der ersten Gruppe (Patient DK) hatten einen überwiegend CD7⁻ Phänotyp. Hier waren paraklinisch konstant erhöhte Leukozytenwerte, hohe Zahl CD4⁺ Lymphozyten und leicht erhöhte LDH-Werte vorhanden. Die zweite Gruppe (Patienten OS, RM, SH) zeigten einen intermediären CD7-Phänotyp der Tumorzellen. Hier waren eine erhöhte CD4/CD8-Ratio, erhöhte LDH-Werte und z.T. erhöhte Leukozytenzahlen auffällig. In der dritten Gruppe (Patient FN) konnten überwiegend CD7⁺ Tumorzellen nachgewiesen werden. Hier konnte eine Abnahme der CD3⁺ Zellen und gleichzeitig ein Absinken der CD4/CD8-Ratio beobachtet werden.

Schwab et al. untersuchten mit Hilfe TCR-V β -Antikörpern in einer FACS-Analyse die Tumorlast bei Sézary Syndrom Patienten. Dort wurde beobachtet, dass unter der

angewandten Therapie bei drei Patienten eine Abnahme der $CD4^+V\beta_{tm}^+$ Zellen im Verlauf stattfand. Es wurde eine komplette Remission, eine partielle Remission und ein Todesfall dokumentiert. Bei zwei weiteren Patienten wurden keine Veränderungen in dem Anteil der $TCR-V\beta_{tm}^+$ und der Klinik der Patienten festgestellt (Schwab et al. 2002). Diese therapeutischen Erfolge konnten von uns, bei ähnlichen Therapieschemata, nicht beobachtet werden. Die Dokumentation der Tumorlast im Blut wird auch von den Daten unserer Arbeit unterstützt, allerdings bietet sich hier die Dokumentation der $CD3^+CD26^-$ Zellen an. Dies hat den Vorteil, dass auch Patienten ohne dominante $TCR-V\beta^+$ Zellen bzw. Patienten, die auf den PBMC ein $TCR-V\beta$ exprimieren, dass von bisher erhältlichen Antikörpern nicht erkannt wird, ein Monitoring erhalten können.

Ein weiteres Ziel der verschiedensten Untersuchungen zum Phänotyp der Tumorzellen beim Sézary Syndrom ist die Identifizierung eines Parameters zur Diagnosesicherung bzw. –erhärtung.

Nach den hier gefundenen Ergebnissen einer variablen $CD7$ -Expression auf den Tumorzellen scheint zur Erhärtung der Diagnose Sézary Syndrom die Bewertung der $CD7$ -Expression als ungeeignet. Wie beschrieben, konnte bei allen hier untersuchten Patienten eine konstante Defizienz von $CD26$ sowohl in der FACS-Analyse als auch in den molekularbiologischen Untersuchungen gezeigt werden. Dies bestätigt die Beobachtungen von Bernengo et al., dass die $CD26$ Expression besser mit der Klinik und mit paraklinischen Daten korreliert als die Analyse der $CD7$ Expression (Bernengo et al. 2001). Die hier gefundene Tumorzellverteilung in der $CD26$ Population eröffnet möglicherweise die Chance für eine Beurteilung der Tumorlast im Blut von Sézary Syndrom Patienten. Eine von Bernengo et al. vorgeschlagene Untersuchung der $CD3^+$ bzw. $CD4^+$ Zellen auf eine $CD26$ Defizienz bei Verdacht auf Sézary Syndrom scheint sinnvoll (Bernengo et al. 2001).

5.3.2 CD7 und CD26 Expression in Korrelation zum Überleben der Patienten

Für die Einschätzung der Malignität einer Erkrankung und den Erfolg von Therapieschemata ist die Überlebenszeit ein entscheidendes Kriterium.

Betrachtet man die Überlebenszeiten der hier untersuchten Patienten, stellen sich drei Gruppen dar. Zum einen, die der Patienten, die zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch lebten (Patient FN), zum anderen eine Gruppe Patienten, die mehr als fünf Jahre nach Diagnosestellung lebten (Patient DK) und des weiteren die Gruppe mit den Patienten die kurze Zeit nach der Diagnose Sézary Syndrom verstarben (Patient OS, RM, SH). Schaut

man sich diese drei Gruppen in bezug zum exprimierten Phänotyp der PBMC und der Tumorzellen an, werden einige Unterschiede in den Gruppen deutlich.

So zeigte die erste Gruppe in der FACS-Analyse ein $CD7^+$ bzw. $CD26^+$ Expressionsmuster und einen hohen Anteil $CD7^+CD26^+$ Zellen. Die Tumorzellen dieser Patientengruppe wiesen einen überwiegend $CD7^+$ Phänotyp auf. Auffallend ist der meist nicht klonale Ursprung der $CD26^+$ Zellen. In der zweiten Gruppe fand sich ein $CD7^-$ und $CD26^-$ Phänotyp sowohl der PBMC als auch der Tumorzellen. $CD26^+$ Zellen waren kaum vorhanden und die $CD7^-CD26^-$ Zellen dominierten. Die Gruppe der „kurze Zeit nach Diagnose verstorbenen“ zeigte eine intermediäre Expression von CD7 auf den PBMC und den Tumorzellen. In dieser Gruppe waren etwas mehr $CD26^+$ Zellen als in der zweiten Gruppe zu finden, ob schon die $CD26^-$ den größten Anteil hatten.

Die aus diesen Beobachtungen resultierende Schlussfolgerung ist die, dass Sézary Syndrom Patienten mit einer geringen Anzahl $CD26^+$ bzw. $CD7^+CD26^+$ Zellen eher versterben. Desweiteren kann man die Überlegung anstellen, ob ein intermediäres CD7 Expressionsmuster mit einem früheren Versterben als die beiden dominanten Phänotypen assoziiert sein könnte. Die Thesen gelten jedoch nur eingeschränkt, da zum einen die Patientenzahl gering und zum anderen der Beobachtungszeitraum von FN relativ kurz ist.

Der Zusammenhang zwischen einer vermehrter CD7 Expression und einer günstigeren Prognose ist von einigen Autoren vermutet worden (Bernengo et al. 1998), kann hier aber nur bedingt bestätigt werden. Bernengo et. al. veröffentlichten, dass eine vermehrte CD7 Expression mit einer besseren Prognose assoziiert sei (Bernengo et al. 1998). Auch der von Laetsch et. al. beschriebene Zusammenhang von erhöhten $CD7^-$ Zellzahlen und einem positivem PCR-Ergebnis mit einem fortgeschrittenem Stadium der Krankheit kann nicht gestützt werden (Laetsch et al. 2000), da hier bei allen Patienten, unabhängig von der Prognose, ein positives PCR-Ergebnis und $CD7^-$ Zellen zu finden waren..

Die von uns gemachten Beobachtungen werden durch die Beschreibung von Schwab et al. bestätigt. Sie zeigten an sieben Patienten, dass $CD7^-$ Zellen bei sechs Patienten vorhanden waren (Schwab et al. 2002). Ordnet man die dort untersuchten Patienten unseren aufgestellten Gruppen zu, dann beobachtet man, dass Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf einen intermediären Expressionstyp zeigen, Patienten mit einem stabilen Krankheitsbild ebenfalls intermediäres Expressionsmuster, jedoch mit einem höheren Anteil an $CD4^+CD7^-$ als die Patienten mit progredienten Krankheitsverlauf. Patienten mit einer partiellen bzw. kompletten Remission waren in der Gruppe mit positivem und intermediärem Expressionsmuster zu finden, jedoch war hier ein geringerer Anteil an $CD4^+CD7^-$ Zellen als in dem Kollektiv mit progredientem Krankheitsverlauf zu finden.

Veröffentlichungen zur prognostischen Relevanz der CD26 Expression wurden bisher

Dissertation S. Schöpp

nicht publiziert. Anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten kann vermutet werden, dass Patienten mit einem hohen Anteil nicht-klonaler CD26⁺ Zellen eine bessere Prognose aufweisen.

5.3.3 Diskussion des Zusammenhangs zwischen den weiteren klinischen und paraklinischen Parametern und der Prognose des Sézary Syndroms

Zur Einschätzung der Prognose von Patienten mit Sézary Syndrom werden mehrere vor allem paraklinische Werte als signifikant diskutiert. So sollen eine hohe Leukozytenzahl, eine erhöhte Zahl CD4⁺ Zellen und damit auch eine erhöhte CD4/ CD8 Ratio eine prognostische Signifikanz haben (Bernengo et al. 1998, Fraser-Andrews et al. 2001). Bei den hier untersuchten Patienten zeigte sich dieser Zusammenhang ebenfalls.

Von den bisher untersuchten Blutenzymen von Patienten mit Sézary Syndrom zeigte eine erhöhte Serum-LDH prognostische Signifikanz (Bernengo et al. 1998, Fraser-Andrews et al. 2001). Dieses Enzym, das bei Tumorerkrankungen erhöht sein kann, zeigte auch bei den Patienten in dieser Arbeit einen Zusammenhang mit der Überlebenszeit.

In einigen Publikationen wurden komplette und auch partielle Remissionen beim Sézary Syndrom beschrieben (Schwab et al. 2002). Bei keinem hier untersuchten Patienten konnte eine solche Beobachtung gemacht werden.

6 Zusammenfassung und Thesen

6.1 Zusammenfassung

Molekularbiologische Methoden und durchflußzytometrische Analysen haben sich seit ca. 10 Jahren in Diagnostik und Monitoring des Sézary Syndroms etabliert. Dabei wurde dem Klonalitätsnachweis im Blut und der immunophänotypischen Analyse der PBMC besondere Beachtung geschenkt. Es gelang über die Amplifikation des TCR- γ -Gen Rearrangements der Nachweis von klonalen T-Zellen im Blut. In Ansätzen wurde versucht mit Hilfe von anti-TCR-V β -Antikörpern, klonale Zellen zu identifizieren. Weitergehende durchflußzytometrische Analysen beschreiben den Verlust von T-Zell Antigenen, insbesondere CD7 und CD26, auf den PBMC beim Sézary Syndrom.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung klonal expandierter T-Zellen in PBMC, die Charakterisierung der CD7 und CD26 Expression auf den PBMC und die Entwicklung einer Methode zur Beschreibung der CD7 und CD26 Expression der klonalen Zellen.

Hierzu wurden zunächst für alle Patienten die TCR- γ und TCR- β Sequenz des T-Zell-Klons ermittelt. Anschließend erfolgte die Entwicklung klonspezifischer Primer und die Etablierung einer qualitativen klonspezifischen PCR. Es konnte für alle Patienten eine klonspezifische PCR mit Hilfe klonspezifischer Primer etabliert werden.

Die PBMC von an Sézary Syndrom erkrankten Patienten wurde in einer durchflußzytometrischen Analyse auf die Expression von CD7 und CD26 untersucht (FACS) und entsprechend in positive und negative Zellpopulationen aufgetrennt. Im Anschluss an die DNA-Gewinnung aus den mittels *CellSorter* präparierten Zellen wurde eine qualitative und quantitative klonspezifische PCR durchgeführt. Die an den sortierten PBMC durchgeführte qualitative PCR wies klonale Zellen sowohl in den CD7^{+/} als auch in den CD26^{+/} Populationen nach. Anhand der Daten der quantitativen PCR war die Bestimmung der Verteilung der klonalen Zellen auf die einzelnen Populationen möglich.

Die Analysen erbrachten folgende grundsätzliche Ergebnisse: Der genetisch definierte Tumorzellklon beim Sézary Syndrom zeigt verschiedene Phänotypen, wobei CD3⁺CD7⁻CD26⁻ und CD3⁺CD7⁺CD26⁻ Tumorzellen dominieren und zeitgleich bei ein und demselben Patienten vorkommen können. Aufgrund des konstanten CD26⁻ Phänotyps der Tumorzellen ist eine Abschätzung der Tumorlast über die Bestimmung der CD3⁺CD26⁻ Zellen möglich.

Im einzelnen stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar: Die CD7-Expression der CD3⁺

Zellen im Blut von Sézary Syndrom Patienten ist geringer als bei gesunden Personen. Der CD7-Phänotyp der PBMC ist beim einzelnen Patienten weitestgehend konstant, er variiert jedoch erheblich zwischen den Patienten. Die CD26-Expression der CD3⁺ Zellen ist geringer ausgeprägt als bei gesunden Personen, zeigt teilweise intraindividuelle Schwankungen und variiert zwischen den Patienten, jedoch nicht so stark wie CD7.

Desweiteren zeigte sich, dass die Entwicklung von klonenspezifischen Primern zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Tumorzellklons möglich ist.

Die Analyse der klonalen Zellen erbrachte, dass die CD7-Expression des dominanten T-Zellklons im Blut von Sézary Syndrom Patienten inhomogen ist, d.h. die klonalen Zellen können sowohl CD7⁺ als auch CD7⁻ sein. Der Phänotyp der klonalen Zellen unterliegt im individuellen Verlauf nur geringen Schwankungen, zeigte aber große interindividuelle Unterschiede. Diese ermöglichen eine Einteilung in eine überwiegend CD7⁺, überwiegend CD7⁻ und intermediäre Expression. Hinsichtlich der CD26 Expression ließ sich für die klonalen Zellen ein überwiegend CD26⁻ Phänotyp zeigen, der nahezu keinen intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegt. Die CD26 Expression der klonalen Zellen ist dominiert von einer CD26⁻ Zellen und unterliegt nahezu keinen intra- und interindividuellen Schwankungen.

Anhand des Überlebens der Patienten lassen sich drei prognostische Gruppen abgrenzen: eine Gruppe repräsentiert die zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch lebenden Patienten, hier finden sich im Blut ein hoher Anteil CD7⁺ Tumorzellen. Darüber hinaus existiert ein erheblicher Anteil CD3⁺CD26⁺ nicht-klonaler Zellen. Eine weitere Gruppe beinhaltet die Patienten mit einer Überlebenszeit von mehr als fünf Jahren. Hier zeigen sich im Blut klonale Zellen, die fast ausschließlich CD7⁻ und CD26⁻ sind. Die dritte Gruppe stellt die Gruppe mit der schlechtesten Prognose dar, hier konnten im Blut sowohl CD7⁺ als auch CD7⁻ Tumorzellen nachgewiesen werden. Desweiteren existierte nur eine minimale Anzahl CD26⁺ nicht-klonaler Zellen

Anhand dieser Ergebnisse können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die beim Sézary Syndrom auftretenden Tumorzellen zeigen einen überwiegend CD7⁻ CD26⁻ und CD7⁺CD26⁻ Phänotyp.
- Die Bestimmung der CD3⁺CD26⁻ Zellen ermöglicht beim Sézary Syndrom eine Abschätzung der Tumorlast.
- eine Prognoseabschätzung ist über eine kombinierte CD7 und CD26 Bestimmung im Blut wie folgt möglich:

1. Bestimmung des Anteils der CD7⁺ an den CD3⁺ Zellen.
→ Ist dieser Anteil dominant negativ, kann von einer Überlebenszeit von mehr als fünf Jahren ausgegangen werden.
→ stellt sich dieser Anteil als intermediär oder positiv heraus folgt Untersuchung 2.
2. Bestimmung der CD26⁺ an den CD3⁺ oder Bestimmung der CD7⁺CD26⁺
→ ist der Anteil dieser Zellen gering, liegt die Überlebenszeit unter fünf Jahre
→ ist dieser Anteil hoch, kann mit einem langen Überleben der Krankheit gerechnet werden.

Für die hier dargestellten Aussagen müssen jedoch die Einschränkung aufgrund der geringen Fallzahl dieser Studie, den unterschiedlichen Therapieschemata und dem kurzen Beobachtungszeitraum beachtet werden.

6.2 Thesen

- Der genetisch definierte Tumorzellklon zeigt eine heterogene Expression von CD7 und eine weitgehend homogene CD26 Defizienz.
- Eine Abschätzung der Tumorlast ist über die Bestimmung der CD3⁺CD26⁻ möglich.
- Die CD7 Expression der CD3⁺ Zellen ist bei Patienten mit Sézary Syndrom geringer als bei Gesunden. Während die CD7 Expression bei Sézary Syndrom Patienten intraindividuell relativ konstant, ist zeigt sich eine hohe Varianz zwischen den Patienten.
- Diese Varianz in der CD7 Expression zwischen den Sézary Syndrom Patienten hat möglicherweise eine prognostische Bedeutung.

Literatur

- Ahnhudt C, Muche M, et al.: An approach to the sensitivity of temperaturgradient gel electrophoresis in the detection of clonally expanded T-cells in cutaneous T-cell lymphoma. *Electrophoresis* 2001;22:33-38
- Bernengo M, Quaglino P, et al.: Prognostic factors in Sézary syndrome: A multivariate analysis of clinical, haematological and immunological features. *Annals of Oncology* 1998;9:857-863
- Bernengo M, Novelli M, et al.: The relevance of the CD4+CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br J Dermatol* 2001;144:125-135
- Bigler R, Boselli C, et al.: Failure of anti-T-cell receptor V beta antibodies to consistently identify a malignant T-cell clone in Sezary syndrome. *Am J Pathol* 1996;149:1477-1483
- Breit T, Wolvers-Tettero I, et al.: Receptor diversity of human T-cell receptor $\gamma\delta$ expressing cells. *Progress in Histo- and Cytochemistry* 1992;26:182-193
- Breslauer K, Frank R, et al.: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1986;83: 3746-3750
- Bogen S, Pelley D, et al.: Immunophenotypic Identification of Sezary Cells in the Peripheral Blood. *Am J Clin Pathol* 1996;106:739-748
- Bsnier E, Hallopeau: On the erythrodermia of Mycosis fungoides. *J Cutan Genitouri Disease* 1892;10:453
- Buechner S, Winkelmann R: Sézary Syndrome: A clinicopathologic Study of 39 Cases. *Arch Dermatol* 1983;119:979-986
- Burg G, Dummer R, et al.: Classification of Cutaneous Lymphomas. *Dermatologic Clinics* 1994;12(2): 213-217
- Chan A, Reynolds P, et al.: Tyrosine kinase activity associated with the CD7 antigen: correlation with regulation of T cell integrin function. *Eur J Immunol* 1994;24:2602-2608
- Chan D, Liang R, et al.: Detection of T-Cell Receptor Delta Gene Rearrangement in T-Cell Maligancies by Clonal Specific Polymerase Chain Reaction and its Application to detect minimal residual Disease. *American Journal of Hematology* 1996;52:171-177
- Dongen J, Comans-Bitter M, et al.: Development of human T lymphocytes and their thymus-dependency. *Thymus* 1990;16(3-4):207-234
- Dummer R, Haeffner A, et al.: Cutaneous T-Cell lymphomas (CTCL): new aspects in PCR-based diagnostic tools, immunology and treatment. *Eur J Dermatol* 1994;4(4): 281-286
- Dummer R, Nestle F, et al.: Genotypic, phenotypic and functional analysis of CD4+CD7+ and CD4+CD7- T lymphocyte subsets in Sézary syndrome. *Arch Dermatol Res* 1999;291:307-311
- Dummer R, Nestle F, et al.: Pathogenesis of Cutaneous Lymphomas. *Semin Cutan Med Surg* 2000;19:78-86
- Dummer R, Willers J, et al.: Aktuelle Aspekte zur Pathogenese von Sézary-Syndrom und Mycosis fungoides. *Hautarzt* 2001;52:189-192
- Eckert C, Landt O, et al.: Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: *Leukemia* 2000;14(2):316-23
- Edelson R, Lutzner M: Morphologic and functional properties of the atypical T-Lymphocytes of Sézary Syndrome. *Mayo Clin Proc* 1974;49: 558-66
- Edelson R: Cutaneous T cell lymphoma: Mycosis fungoides, Sézary syndrome, and other variants. *J Am Acad Dermatol* 1980;2(2): 89-106

Dissertation S. Schöpp

- Fink-Pouches R., Zenahlik P., et al.: Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* 2002;99(3): 800-805
- Forster A, Huck S, et al.: New subgroups in the human T-cell rearranging V(gamma) gene locus. *EMBO* 1987;6: 1945-50
- Fraser-Andrews E, Russel-Jones R, et al.: Diagnostic and Prognostic Importance of T-Cell Receptor Gene Analysis in Patients with Sézary Syndrome. *Cancer* 2001;92:1745-1752
- Fritsch: "Dermatologie und Venerologie"-Lehrbuch und Atlas, Springer 1998;634-639
- Ginaldi L, Farahat N, et al.: Differential expression of T cell antigens in normal peripheral blood lymphocytes: a quantitative analysis by flow cytometrie. *J Clin Pathol* 1996;49:539-544
- Ginés S, Marino M, et al.: Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J* 2002;361:203-209
- Gorrell M, Gysbers V, et al.: CD26: A Multifunctional Integral Membrane and Secretes Protein of Activated Lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001;54:249-264
- Gutzmer R, Mommert S, et al.: Detection of Clonal T Cell Receptor γ Gene Rearrangements in Cutaneous T Cell Lymphoma by LightCycler-Polymerase Chain Reaction. *J Invest Dermatol* 2001;116:926-932
- Harris N., Jaffe E., et al.: A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84(5): 1361-1392
- Harmon C, Witzig T, et al.: Detection of circulating T cells with CD4+CD7- immunophenotype in patients with benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:404-410
- Haynes B, Bunn P, et al.: Cell surface Differentiation Antigens of the Malignant T Cell in Sezary Syndrome and Mycosis Fungoides. *J Clin Invest* 1981;67:523-530
- Hildebrandt M, Reutter W, et al.: A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition an immune defence. *Clin Science* 2000;99:93-104
- Isaacson P, Norton A: "Extranodal Lymphoma" Churchill Livingstone 1994; 172
- Jaffe E, Harris N, et al.: World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Am J Clin Pathol* 1999;S8-S12
- Jakob T, Neuber K, et al.: Stage-dependent Expression of CD7, CD45RO, CD45RA and CD25 on CD4-positive Peripheral Blood T-Lymphocytes in Cutaneous T-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol* 1996;76:34-36
- Johnson G, Dewald G, et al.: Chromosome studies in 17 patients with the Sezary syndrome. *Cancer* 1985;55(10):2426-2433
- Jones D, Dang N, et al.: Absence of CD26 Expression Is a Useful Marker for Diagnosis of T-Cell Lymphoma in peripheral Blood. *Am J Clin Pathol* 2001;115:885-892
- Jung R, Soondrum K, et al.: Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(9):833-836
- Kneba M, Bolz I, et al.: Characterization of Clone-Specific Rearranged T-Cell Receptor γ -Chain Genes in Lymphomas and Leukemias by the Polymerase Chain Reaction and DNA Sequencing. *Blood* 1994;84(2):574-581
- Kneba M, Bolz I, et al.: Analysis of rearranged t cell receptor β -chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR Fragment Analysis. *Blood* 1995;96: 3930-37
- Kukel S, Reinhold U, et al.: Progressive increase of CD7- T cells in human blood lymphocytes with ageing. *Clin Exp Immunol* 1994;98:163-168
- Laetsch B, Haeffner A, et al.: CD4+/CD7- T Cell Frequency and Polymerase Chain Reaction-Based Clonality Assay Correlate with Stage in Cutaneous T Cell Lymphoma. *J Inv Dermatol* 2000;14(1):107-111

Dissertation S. Schöpp

- Lazarovits A, Osman N, et al.: CD7 is Associated with CD3 and CD45 on Human T Cells. *J Immunol* 1994;153:3956-3966
- Lee B, Duvic M, et al.: Dysregulated Synthesis of Intracellular Type 1 and Type 2 Cytokines by T Cells of Patients with Cutaneous T Cell Lymphoma. *Clin Diag Lab Immunol* 1999;6(1):79-84
- Lefranc M, Chuchana P, et al.: Molecular mapping of the human T-cell receptor gamma (TRG) genes and linkage of the variable and constant regions. *Eur J Immunol* 1989;19: 989-94
- Lessin S, Rook A, et al.: Molecular Diagnosis of Cutaneous T-Cell Lymphoma: Polymerase Chain Reaction Amplification of T-Cell Antigen Receptor β -Chain Gene Rearrangements. *J Invest Dermatol* 1991;91:299-302
- Liu L, Abken H, et al.: Accumulation of CD4+CD7- T cells in inflammatory skin lesions: evidence for preferential adhesion to vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000;121:94-99
- Lukowsky A, Audring H, et al.: Nachweis von monoklonalen T-Zellen mittels TCR γ -PCR bei Mycosis Fungoides(MF). *Hautarzt* 1998;49:641-645
- Lukowsky A, Muche M, et al.: Detection of expanded T Cell Clones in Skin Biopsy Samples of Patients with Lichen Sclerosus et atrophicus by T Cell Receptor- γ Polymerase Chain Reaction Assays. *J Invest Dermatol* 2000;115(2):254-259
- Lutzner M, Jordan H: The ultrastructure of an abnormal cell in Sézary Syndrom. *Blood* 1968;31:719-726
- Meyer C, Leeuwen A, et al.: Cerebriform (Sezary Like) Mononuclear Cells in Healthy Individuals: A Morphologically Distinct Population of T Cells. *Virchows Arch B Cell Path* 1977;25:95-104
- Meyer J, Hassam S, et al.: A realistic approach to the sensitivity of PCR-DGGE and its application as a sensitive tool for the detection of clonality in cutaneous T-cell proliferations. *Exp Dermatol* 1997;6(3):122-127
- Mielke V, Staib G, et al.: Clonal disease in early cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 1994;12:351-360
- Moss P, Charmley P, et al.: The Repertoire of T Cell Antigen Receptor β -Chain Variable Regions Associated with Psoriasis Vulgaris. *J Invest Dermatol* 1997;109(1):14-19
- Muche M : PCR- und Elektrophoresetechniken zum Nachweis einer monoklonalen T-Zell-Vermehrung am Beispiel der Diagnostik der Mycosis fungoides. Dissertation 1995.
- Muche M, Lukowsky A, et al.: Demonstration of Frequent Occurrence of Clonal T-Cells in the Peripheral Blood of Patients With Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Blood* 1997;90(4):1636-1642
- Muche M, Lukowsky A, et al.: Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood*. 1999;94(4):1409-1417
- Muche M, Gellrich S, et al.: Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Sem Cut Med Surg* 2000;19(2):142-148
- NCBI-Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>*
- Novelli M, Quaglino P, et al.: CD4+CD26- Evaluation is a more useful Diagnostic Parameter than CD4+CD7- in Sezary Syndrome(SS). *J Invest Dermatol* 1995;105(3):515
- Ostendorf P, Seeber S: Hämatologie Onkologie. Urban & Schwarzenberg 1997;33-38
- Pace K, Hahn H, et al.: Cutting Edge: CD7 Delivers a Pro-Apoptotic Signal During Galectin-1-Induced T Cell Death. *J Immunol* 2000;165:2331-2334
- Pfützner T, Reiser M, et al.: Quantitative molecular monitoring of residual tumor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 2002;81(5):258-266
- Powell E, Kroon P, et al.: Measurement of mRNA by quantitative PCR with nonradioactive label. *J Lipid Res* 1992;33: 609-14
- Rappl G, Muche M, et al.: CD4+CD7- T cells compose the dominant T-cell clone in the peripheral blood of patients with Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(3):456-461
- Rappl G, Abken H, et al.: CD4+CD7- leukemic T cells from patients with Sézary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia* 2002;16:840-845

Dissertation S. Schöpp

- Rasmussen R.: Quantification on the LightCycler. in Meuer S, et al.: Rapid cycle real-time PCR, Springer, Heidelberg 2001: 21-35
- Reischl U, Kochanowski B: Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology* 1995;3: 55-71
- Reinhold U, Abken H, et al.: CD7- T Cells Represent a subset of Normal Human Blood Lymphocytes. *J Immunol* 1993;150(5):2081-2089
- Reinhold U, Liu L, et al.: CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells. *Immunology* 1996;89:391-396
- Roche Molecular Biochemicals (a) : Light-Cycler-System. Real-time PCR- as flexible as you are. 2000; 12-14
- Roche Molecular Biochemicals : Overview of Lightcycler quantification methods, Technical Note LC 2000; 10:11
- Rowen L, Koop B, et al.: The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta cell receptor locus. *Science* 1996;272:1755-1762
- Russel-Jones R, Whittaker S: T-cell receptor gene analysis in the diagnosis of Sézary Syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1999;41(2):254-258
- Russel-Jones R, Whittaker S: Sézary Syndrome: Diagnostic Criteria and therapeutic Options. *Sem Cut Med Surg* 2000;19(2):100-108
- Sarris A, Jiang Y, et al.: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Monitoring Minimal Residual Disease in Patients With Advanced Indolent Lymphomas Treated with Rituximab, Fludarabine, Mitoxantrone, and Dexamethasone. *Semin Oncol* 2002;29(2):48-55
- Scala E, Russo G, et al.: Skewed Expression of Activation, Differentiation and Homing-Related Antigens in Circulating Cells from Patients with Cutaneous T Cell Lymphoma Associated with CD7- T Helper Lymphocytes Expansion. *J Invest Dermatol* 1999;113:622-627
- Scarisbrick J, Whittaker S, et al.: Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2001;97(3):624-629
- Scarisbrick J, Woolford A, et al.: Allelotyping in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome: Common Regions of Allelic Loss Identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 2001;117(3):663-670
- Scarisbrick J, Woolford A, et al.: Frequent Abnormalities of the P15 and P16 Genes in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *J Invest Dermatol* 2002;118(3): 493-499
- Schwab C, Willers J, et al.: The use of anti-T-cell receptor-V β antibodies for the estimation of treatment success and phenotypic characterization of clonal T-cell populations in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Haematol* 2002;118:1019-1026
- Sézary A, Bouvrain Y: Erythrodermie avec presence de cellules monstreuses dans le derme et dans le sang circulant. *Bull Soc Fr Dermatol Syph* 1938;45:254-260
- Sempowski G, Lee D, et al.: Structure and Function of the CD7 Molecule. *Crit Rev Immunol* 1999;19:331-348
- Sharp J, Chan W: Detection and relevance of minimal disease in lymphomas. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1): 127-142
- Sterry W, Mielke V, et al.: CD4+ Cutaneous T-Cell Lymphomas Show the Phenotype of Helper/Inducer T Cells (CD45RA-, CDw29+). *J Invest Dermatol* 1989;93:412-416
- Taswell H, Winkelmann R: Sézary Syndrome - a malignant reticulemic erythroderma. *JAMA* 1961;117:465-472
- Trainor K.J., Brisco M.J., et al.: Gene Rearrangement in B- and T- Lymphoproliferative Disease Detected by the Polymerase Chain Reaction. *Blood* 1991;78(1):192-196
- Veelken H, Wood G, et al.: Molecular Staging of Cutaneous T-Cell Lymphoma: Evidence for Systemic Involvement in Early Disease. *J Invest Dermatol* 1995;104:889-894
- Verstovsek S, Cabanillas F, et al.: CD26 in T-Cell Lymphomas: A Potential Clinical Role?. *Oncology* 2000;14(6):17-23

Dissertation S. Schöpp

- Volkenandt M, Soyer H, et al.: Development of a Highly Specific and Sensitive Molecular Probe for Detection of Cutaneous Lymphoma. *J Invest Dermatol* 1991;97:137-140
- Volkenandt M, Soyer H, et al.: Molecular detection of clone-specific DNA in hypopigmented lesions of a patient with early evolving mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 1993;128:423-428
- Vonderheid E, Bigler R, et al.: Variable CD7 Expression on T Cells in the Leukemic Phase of Cutaneous T Cell Lymphoma (Sezary Syndrome). *J Invest Dermatol* 2001;117(3): 654-662
- Vonderheid E, Bernengo G, et al.: Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:95-106
- Weinberg J, Jaworsky C, et al.: The Clonal Nature of Circulating Sezary Cells. *Blood* 1995;86(11):4257-4262
- Wetmur J. : DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Critical Revue in Biochemistry and Molecular Biology* 1991;26: 227-259
- Whittaker S, Smith N, et al.: Analysis of β , γ and δ T-Cell Receptor Genes in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Cancer* 1991;68:1572-1582
- Whittaker S: Molecular Genetics of Cutaneous Lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 2001;941:39-45
- Wieselthier J, Koh H et al.: Sézary Syndrome: Diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol* 1990;22(3):381-401
- Willemze R., Kerl H., et al.: EORTC Classification for Primary Cutaneous Lymphomas: A Proposal From the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997;90(1):354-371
- Willemze R., Meijer C.: EORTC Classification for Primary Cutaneous Lymphomas: The Best Guide to Good Clinical Management. *The Am J Dermatopathol.* 1999;21(3): 265-273
- Wood G, Hong S, et al.: Leu-8/CD7 antigen expression by CD3+ T cells: Comparative analysis of skin and blood in mycosis fungoides/Sézary syndrome relative to normal blood values. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:602-607
- Wood G, Haeffner A, et al.: Molecular Biology Techniques for the diagnosis of cutaneous T-Cell Lymphoma. *Dermatologic Clinics* 1994;12(2):231-241
- Zelickson B, Peters M, et al.: T-cell receptor gene rearrangement analysis: Cutaneous T cell lymphoma, peripheral T cell lymphoma, and premalignant and benign cutaneous lymphoproliferative disorders. *J Am Acad Dermatol* 1991;25:787-796

Dissertation S. Schöpp

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Sebastian Schöpp

Dissertation S. Schöpp

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich insbesondere Herrn PD Dr. A. Lukowsky und Herrn Dr. med. M. Muche für ihre engagierte Betreuung der Arbeit danken. Sie standen mit jederzeit mit wertvollen Anregungen für meine theoretische und praktische Arbeit zur Seite.

Den Mitarbeiterinnen Frau K. Schreiber und Frau Katharina Dijkstal danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau M. Marchwat für den sicheren Rückhalt in anspruchsvollen Phasen der Arbeit und die gründliche Revision des Skriptes.