Thema: „Erforschung der Ätiopathogenese primär kutaner Lymphome mit Hilfe der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR“

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. med. Sylke Gellrich
geboren am 01.08.1967 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: Mai 2003
öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 04. Dezember 2003

Gutachter:
1. Prof. Dr. R. Dummer
2. Prof. Dr. H. Kerl

Inhaltsverzeichnis

		1
1.	Einleitung	5
2.	Primär kutane Lymphome	6
2.1.	Klassifikation, Histologie und Klinik primär kutaner B-Zell-Lymphome (CBCL)	6
2.1.1.	B-Zell-Lymphome am Stamm und Kopf	7
2.1.1.1.	Keimzentrumszell-Lymphom (FCCL)	7
2.1.1.2.	Immunozytom / Marginalzonenlymphom (IZ / MZL)	8
2.1.2.	Intermediär aggressives großzelliges B-Zell-Lymphom an der unteren Extremität (GBCLL)	8
2.1.3.	Diagnostik und Verlaufskontrolle primär kutaner B-Zell-Lymphome	9
2.1.4.	Therapie kutaner B-Zell-Lymphome	10
2.1.4.1.	Lokale Behandlung	10
2.1.4.2.	Immuntherapie	11
2.1.4.3.	Systemische Therapie	12
2.2.	Klassifikation, Histologie und Klinik primär kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL)	13
2.2.1.	Mykosis fungoides (MF)	13
2.2.2.	Pagetoide Retikulose (PR)	15
2.2.3.	CD30+ großzelliges Lymphom (CD30+LTCL)	16
2.2.4.	Lymphomatoide Papulose	16
2.2.5.	Sézary-Syndrom	17
2.2.6.	Diagnostik und Verlaufskontrolle primär kutaner T-Zell-Lymphome	18
2.2.7.	Therapie primär kutaner T-Zell-Lymphome	19
2.2.7.1.	Lokale Therapie	19
2.2.7.2.	UV-Exposition	20
2.2.7.3.	Kombination verschiedener Therapieverfahren	20
2.2.7.4.	Modulatoren des Immunsystems	20
2.2.7.5.	Fusionsproteine	21
2.2.7.6.	Tumorspezifische Peptidvakzinierung	22
2.2.7.7.	Chemotherapie	23
2.2.7.8.	Knochenmarktransplantation	23
3.	Ätiopathogenese primär kutaner Lymphome	24
3.1	B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Lymphome	24
3.1.1.	Hypothese der Immundysregulation	25
3.1.1.1.	Helicobacter pylori assoziierte MALTome	26
3.1.1.2.	Borrelien assoziierte primär kutane B-Zell-Lymphome	27
3.2.	Das CD30-Molekül in der Lymphomgenese	28
3.2.1.	Die Bedeutung des CD30-Moleküls in nichtkutanen Lymphomen	28
3.2.2.	CD30 und genetische Veränderungen	28
3.2.3.	CD30 und assoziierte Infektionen	28
3.2.4.	Die Bedeutung des CD30-Moleküls in primär kutanen Lymphomen	29
3.3.	Ätiopathogenese der Mykosis fungoides	30
3.3.1.	Bedeutung der T-Zell-Klonalität in Mykosis fungoides und Parapsoriasis en plaques	30
3.3.2.	Infektionserreger	30
3.3.3.	Genetische Prädisposition und genetische Veränderungen	30
3.3.4.	Verlauf und Transformation der Mykosis fungoides	31
3.3.5.	Tumorspezifische Abwehrmechanismen	31

4.	Methoden	32
4.1.	Mikromanipulation	32
4.1.1.	Geschichte der Mikromanipulation	32
4.1.2.	Immunhistochemische Markierung	32
4.1.3.	Hydraulische Mikromanipulation	33
4.2.	Molekularbiologische Analyse	35
4.2.1.	Einzelzell-PCR	35
4.2.2.	Darstellung der PCR-Produkte, Sequenzierung, Datenanalyse	35
4.2.3.	Keimbahn- und Mutationsanalysen	37
4.2.4.	Klonierung	39
4.2.5.	Fluoreszenz-Fragment-Analyse	39
4.3.	Etablierung der PCR für die schweren Ketten der Immunglobulin-Gene am Beispiel des Sjögren-Syndroms	39
5.	Molekulargenetische Einzelzell-Analyse der variablen Anteile der schweren und der leichten Kette von Immunglobulinen in kutanen B-Lymphozyten	42
5.1.	Primär kutane B-Zell-Lymphome sind Keimzentrumszell-Lymphome	42
5.1.1.	Hintergründe und Fragestellungen	42
5.1.2.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	43
5.1.3.	Diskussion	45
5.2.	Intraklonale Diversität bei primär kutanen B-Zell-Lymphomen	50
5.2.1.	Hintergründe und Fragestellungen	50
5.2.2.	Nachweis von intraklonaler Diversität in zeitlich unterschiedlichen, räumlich entfernten Läsionen	50
5.2.2.1.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	50
5.2.3.	Nachweis von intraklonaler Diversität in unterschiedlichen Abschnitten innerhalb einer Läsion	54
5.2.3.1.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	54
5.2.4.	Diskussion	55
5.3.	Untersuchung reaktiver B-Lymphozyten in T-Zell-Lymphomen	58
5.3.1.	Hintergründe und Fragestellungen	58
5.3.2.	B-Zellen im Infiltrat von Mykosis fungoides Läsionen	58
5.3.2.1.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	58
5.3.3.	B-Zell-Repertoire in einem primär kutanen pleomorphen T-Zell-Lymphom	59
5.3.3.1.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	59
5.3.4.	Diskussion	60
6.	CD30+ Zellen in primär kutanen Lymphomen	62
6.1.	CD30+ großzellige T-Zell-Lymphome der Haut	62
6.1.1.	Hintergründe und Fragestellungen	62
6.1.2.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	63
6.1.3.	Diskussion	66
6.2.	CD30+ Zellen in der lymphomatoiden Papulose	67
6.2.1.	Hintergründe und Fragestellungen	67
6.2.2.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	68
6.2.3.	Diskussion	73
6.3.	Zusammenfassung der Analyse von CD30+ Einzelzellen in primär kutanen T-Zell-Lymphomen	74
7.	Verteilung klonaler und polyklonaler T-Zellen im Infiltrat verschiedener Stadien der Mykosis fungoides	75
7.1.	Hintergründe und Fragestellungen	75
7.2.	Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse	75
7.3.	Diskussion	77

8.	Zusammenfassende Betrachtung der Daten und Perspektiven	79
9.	Literatur	84
10.	Abkürzungen	95
11.	Dank	96
12.	Publikationsliste der Verfasserin über primär kutane Lymphome	97
13.	Eidesstattliche Versicherung	100

1. Einleitung

Primär kutane Lymphome sind neoplastische lymphoproliferative Erkrankungen von B- und T-Zellen in der Haut mit einer Inzidenz von 1:100 000. Die Einordnung dieser Erkrankungen erfolgt derzeit in die EORTC-Klassifikation für primär kutane Lymphome, welche die am stärksten akzeptierte Klassifikation unter den dermatologischen Onkologen darstellt (Willemze R, Blood, 1997).

Die Therapie der primär kutanen Lymphome orientiert sich an der überwiegend guten Prognose der Erkrankungen. Zunehmend werden neuere immuntherapeutische Ansätze wie z.B. die Behandlung von primär kutanen B-Zell-Lymphomen mit dem Anti-CD20-Antikörper (Rituximab) oder bei primär kutanen T-Zell-Lymphomen die Anwendung von Vakzinierungen und von einem IL-2 Diphtherie-Fusionsprotein (ONTAK) verfolgt.

Die Ätiopathogenese primär kutaner Lymphome ist nicht detailiert bekannt. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, welche die Entstehung und Entwicklung einiger Entitäten erklären könnte. So besteht beispielsweise eine Assoziation zwischen dem Infektionserreger *Borrelia burgdorferi* und dem Auftreten von primär kutanen B-Zell-Lymphomen. Andererseits kommt es beim Übergang der lymphomatoiden Papulose in ein großzelliges anaplastisches CD30+ Lymphom der Lymphknoten zur Ansammlung genetischer Veränderungen, z.B. einer Mutation des TGF-ß Rezeptor-Gens, welche zur Verhinderung von Apoptose der malignen Zellen führen (Levi E, J Invest Dermatol, 2000; Mori M, Blood, 1999; Schiemann WP, Blood, 1999).

Die Analyse von B- und T-Zellen aus den verschiedenen primär kutanen Lymphomen vermittelt einen Einblick in die Ätiopathogenese dieser Erkrankungen. Mit Hilfe der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR kann die molekularbiologische Analyse in Abhängigkeit von histologischen Kriterien auf zellindividueller Ebene erfolgen. Beispielsweise können Quantität und Lokalisation von klonalen und polyklonalen Lymphozyten in einem immunhistochemisch markierten Infitrat dargestellt werden. Die Analyse der B-Zell-Rezeptor-Gene der schweren und der leichten Kette können Auskunft über die bisherige Entwicklung einer B-Zelle geben und mit physiologischen Situationen, wie sie im Lymphknoten oder im peripheren Blut zu finden sind, oder mit anderen Tumoren verglichen werden. Die Methodik der Mikromanipulation und anschließenden Einzelzell-PCR eignet sich gut zur Untersuchung primär kutaner Lymphome und wurde in den vergangenen Jahren für unterschiedliche Fragestellungen etabliert und umfangreich zur Erforschung dieser Entitäten eingesetzt.

Die vorliegende Arbeit gibt einerseits einen Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand bei der Klassifikation, Diagnostik und Therapie primär kutaner Lymphome, andererseits werden Analysen von verschiedenen Entitäten der primär kutanen Lymphome, welche mit Hilfe der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR durchgeführt worden sind, dargestellt.

2. Primär kutane Lymphome

Die Beobachtung, daß einige Lymphome über einen längeren Zeitraum ausschließlich an der Haut auftreten, führte zur Akzeptanz besonderer Entitäten, den primär kutanen Lymphomen. Problematisch war dabei jedoch die Einordnung in die damals gebräuchlichen Klassifikationen, wobei vor allem die histologischen Kriterien herangezogen wurden (Schmoeckel C, Arch Dermatol Res, 1979). Zunächst dominierte die Kiel-Klassifikation (Gerard-Marchant R, Lancet, 1974), welche von der amerikanisch geprägten Working Formulation abgelöst wurde (Cancer, 1982). 1994 wurde dann eine gemeinsame Klassifikation durch die International Lymphoma Study Group entwickelt, welche den Namen REAL-Klassifikation (Harris NL, Blood, 1994) erhielt. Damit war die Grundlage zum wissenschaftlichen Erfahrungsaustausch und zur Durchführung internationaler Studien geschaffen.

Die WHO-Klassifikation ist die aktualisierte Form der REAL-Klassifikation und wurde 1997 durch eine Expertengruppe festgelegt (Virginia, 1997). Im Mittelpunkt dieser Klassifikation steht die Definition einzelner Lymphomerkrankungen, die sich reproduzierbar diagnostizieren lassen. Die Einteilung erfolgt auf zwei hierarchischen Ebenen: Zugehörigkeit zur B- oder T-Zell-Ebene und deren Differenzierungs- bzw. Reifungsformen mit Unterscheidung von B- und T-Zelle und peripheren Lymphomen.

Problematisch gestaltete sich weiterhin die Einordnung der primär kutanen Lymphome in die genannten Klassifikationen (Kiel, Working Formulation, REAL), weshalb im Jahre 1997 eine spezielle Klassifikation durch die EORTC- Cutaneous Lymphoma Study Group veröffentlicht wurde, welche vor allem die prognostischen, aber auch die immunhistochemischen, zytogenetischen und molekularbiologischen Besonderheiten der primär kutanen Lymphome beachtet (Willemze R, Blood, 1997). Diese Klassifikation ist die derzeit von den europäischen dermatologischen Onkologen am häufigsten verwendete Klassifikation primär kutaner Lymphome.

Auch in der neusten hämatoonkologischen Klassifikation der WHO finden die kutanen Lymphome nicht ausreichend Berücksichtigung. So werden z.B. MF und SS zusammengefaßt, obwohl es sich um zwei verschiedene Erkrankungen handelt (Virginia, 1997).

2.1. Klassifikation, Histologie und Klinik primär kutaner B-Zell-Lymphome (CBCL)

Im folgenden wird die EORTC-Klassifikation für primär kutane B-Zell-Lymphome mit ihren Entitäten genauer dargestellt (Willemze R, Blood, 1997):

Tabelle I: *EORTC-Klassifikation für primär kutane B-Zell-Lymphome (Willemze R, Blood, 1997)*

Verlauf	Histologische Entität	Häufigste Lokalisation
indolent	• Keimzentrumszell-Lymphom (FCCL) • Immunozytom (IZ) • Marginalzonenlymphom (MZL)	• Stamm und Kopf • Stamm und Extremitäten • Stamm und Extremitäten
intermediär	• großzelliges B-Zell-Lymphom (GBCLL)	• untere Extremitäten
provisorisch	• intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom • Plasmozytom	 • Stamm

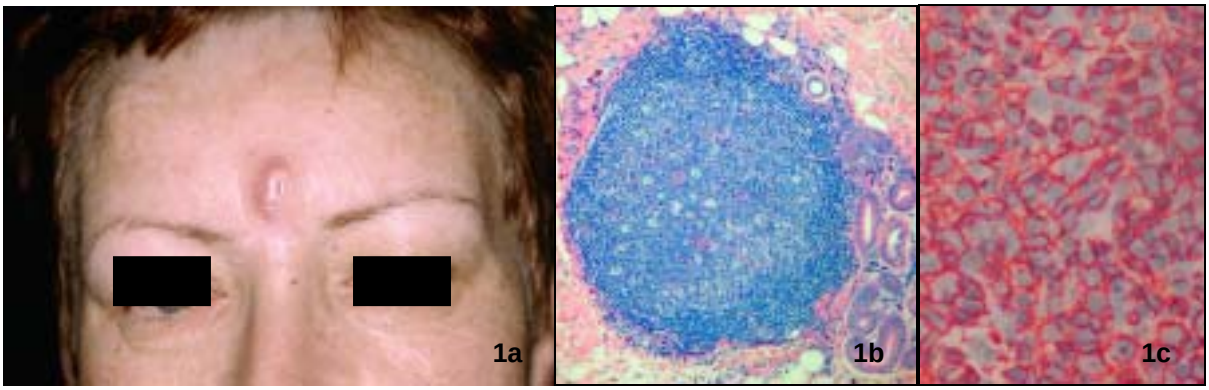
Klinisch sind zwei Manifestationen der primär kutanen B-Zell-Lymphome zu unterscheiden:
das B-Zell-Lymphom am Stamm und Kopf vom großzelligen B-Zell-Lymphom an der unteren Extremität.

2.1.1. B-Zell-Lymphome am Stamm und Kopf

Die hier lokalisierten B-Zell-Lymphome haben indolente Verläufe und unterteilen sich histologisch in Keimzentrumszell-Lymphome, Immunozytome und Marginalzonen-Lymphome:

2.1.1.1. Keimzentrumszell-Lymphom (FCCL)

Anamnestisch beschreiben die Patienten den Beginn der Erkrankung mit dem Auftreten eines rötlichen Knotens am Stamm oder Kopf (Abbildung 1a). Läsionaler Juckreiz ist ein häufig begleitendes Symptom. Erythematöse Frühformen sind beschrieben. Beim Fortschreiten der Läsionen entwickeln sich ulzerierende Tumoren und in näherer Umgebung des primären Manifestationsortes weitere Knoten und Plaques. Regionäre Lymphknotenschwellungen sind stets abklärungsbedürftig. Allgemeine Symptome wie Leistungsschwäche, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Fieber bilden selbst bei ausgedehnter Hautmanifestation die absolute Ausnahme (Cerroni L, Leuk Lymphoma, 2001). Die Prognose der meist jüngeren Patienten ist gut. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 97% (Willemze R, Blood, 1997).
Das FCCL ist ein Tumor, welcher aus Follikelzentrumszellen, gewöhnlich einer Mischung aus Zentrozyten (kleine schmale Zellen mit eingekerbtem Zellkern) und Zentroblasten (große Zellen mit prominentem Kern), besteht (Abbildung 1c).
Unter Aussparung der Epidermis werden noduläre und diffuse Infiltrate beobachtet, welche teilweise aus reaktiven Infiltraten und teilweise aus Tumorzellen bestehen (Abbildung 1b). Vor allem bei länger bestehenden Läsionen nimmt die Zahl der malignen B-Zellen im Infiltrat zu, die der tumorinfiltrierenden Zellen ab. Schnell wachsende Tumore zeigen häufig große monomorphe Zellen mit gelapptem Kern. Die Prognose korreliert nicht mit der Zellmorphologie.
Immunhistochemische Charakterisierung der Tumorzellen: CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, sIg+, CD5-, CD10-, ***bcl*-2-**
Spezifische Translokationen: t[14;18] (Expression des *bcl*-2-Proteins) sehr selten, PCR-IgH-Gen: klonales Rearrangement (Willemze R, Blood, 1997)



Abbildungen 1a: *B-Zell-Lymphom*

Abbildung 1b: *Zentrozyten, Zentroblasten Giemsa 20x,*
Abbildung 1c: *Anti-CD20-Färbung40x*

2.1.1.2. Immunozytom / Marginalzonenlymphom (IZ / MZL)

Die *Immunozytome* und *Marginalzonen-Lymphome* gehören prognostisch gesehen ebenfalls zu den indolenten B-Zell-Lymphomen. Sie manifestieren sich jedoch seltener am Kopf und häufiger an den Extremitäten und am Stamm in Form mehrerer kleiner rötlicher Knoten und Plaques (Abbildung 2a). In der Erfassung der prognostischen Daten hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebensrate wurden diese Entitäten in der EORTC-Klassifikation für primär kutane Lymphome nicht unterschieden, weshalb die gleichen Überlebensdaten gelten (5-Jahres-Überlebensrate 97%) (Willemze R, Blood, 1997).

Die eindeutige Unterscheidung des Immunozytom / Marginalzonen-Lymphom vom Keimzentrumszell-Lymphom ist erst in den letzten Jahren vorgenommen worden und im Einzelfall nicht immer eindeutig zu entscheiden, so daß zunehmend mehr Immunozytome / Marginalzonen-Lymphome diagnostiziert werden. Cerroni et Kerl gehen von einem Anteil dieser Entitäten von ca. 50% aller indolenten Lymphome aus (Cerroni L, Am J Surg Pathol, 1997; Cerroni L, Blood 2002).

In der EORTC-Klassifikation werden das Immunozytom und das B-Zell-Lymphom vom Marginalzonen-Typ aufgrund der gemeinsamen Ursprungszelle zusammengefaßt.

Histologisch findet man monozytoide und zentrozytenähnliche neoplastische B-Zellen. In einigen Fällen werden auch Zentroblasten, Zentrozyten und Immunoblasten gesehen. Bei Bildung reaktiver Follikel befinden sich die Tumorzellen in der Randzone (Marginalzone) (Abbildung 2b), können jedoch auch in die Keimzentren infiltrieren (follikuläre Kolonisation). Diese Entität ist mit den MALT-Lymphomen vergleichbar. Immunhistochemische Charakterisierung der Tumorzellen: sIg+, cIg+/-, CD79+, CD20+/-, CD5-, *bcl*-2-/+, Spezifische Translokationen: t[11;18], Trisomie 3, PCR-IgH-Gen: klonales Rearrangement (Willemze R, Blood, 1997)

Abbildung 2a: *Marginalzonen-Lymphom*

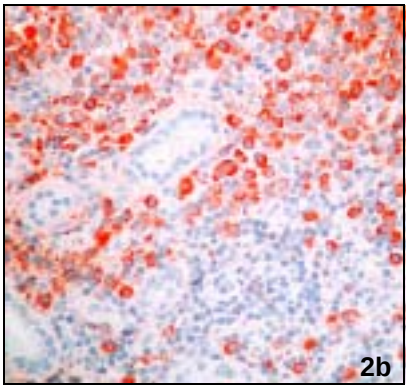


Abbildung 2b: *Marginalzonen-Lymphom, Anti- κ-Färbung 40x*

2.1.2. Intermediär aggressives großzelliges B-Zell-Lymphom an der unteren Extremität (GBCLL)

Es handelt sich bei dieser Entität um eine prognostisch ungünstige Variante des primär kutanen B-Zell-Lymphoms. Innerhalb weniger Wochen entwickeln sich erythematös-livide, unscharf begrenzte, schmerzlose, rasch progrediente Knoten und Plaques, deren Infiltrat teilweise bis in tiefere Gewebeschichten und in die Muskulatur reicht (Abbildung 3a). Ein Lymphknotenbefall der Leiste ist häufig und sollte stets durch Exstirpation eines sonographisch suspekten Lymphknotens oder durch szintigraphische Markierung und histologische Untersuchung des die Läsion drainierenden

Lymphknotens abgeklärt werden. Unbehandelt manifestiert sich diese Entität innerhalb kurzer Zeiträume extrakutan. Die Prognose der meist älteren Patienten (Alter > 70 Jahre) ist mit einer 5-Jahres-Überlebenszeit von 57% schlechter als bei den indolenten Lymphomen (Willemze R, Blood, 1997).

Bei dieser Entität dominieren histologisch große B-Zellen (Immunoblasten, seltener Zentroblasten und Zentrozyten), welche in diffusen, nicht epidermotropen Infiltraten angeordnet sind und klinisch meist am Bein lokalisiert sind (Abbildung 3b/3c).

Immunhistochemische Charakterisierung der Tumorzellen: CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, cIg+ und/oder sIg+ *bcl*-2+

Spezifische Translokationen: t[14;18] + (Expression des *bcl*-2-Proteins), PCR-IgH-Gen: klonales Rearrangement (Willemze R, Blood, 1997)

Abbildung 3a: *B-Zell-Lymphom mit Manifestation am Bein*

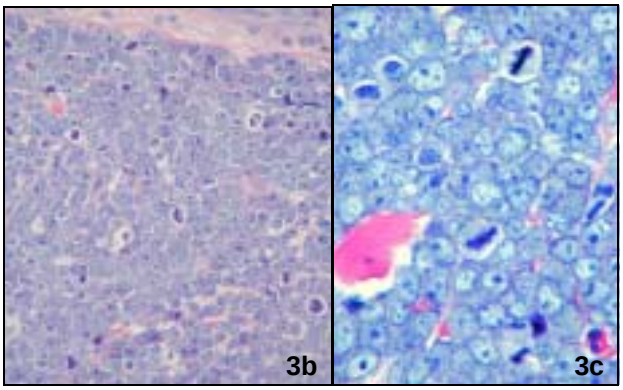


Abbildung 3b: *großzelliges B-Zell-Lymphom Giemsa 40x*
Abbildung 3c: *Immunoblasten, Zentroblasten, Mitosen, 80x*

2.1.3. Diagnostik und Verlaufskontrolle kutaner B-Zell-Lymphome

Klinische Voraussetzung für die Einordnung primär kutaner B-Zell-Lymphome in die EORTC-Klassifikation ist der Ausschluß einer extrakutanen Manifestation des Hautlymphoms. Dafür wird folgende Diagnostik empfohlen: Erfassung von B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), Blutuntersuchungen (Differential-Blutbild, FACS, PCR für die IgH- und TCR-γ-Gene, Serum-Elektrophorese mit Immunfixation, Parameter für Leber und Niere, Entzündungsparameter, Borrelienserologie), Urinstatus, Bence-Jones-Protein, Knochenmarkbiopsie (Histologie und Zytologie), Röntgen-Thorax, Ultraschall des Abdomens und der cervikalen, axillären, inguinalen Lymphknotenregionen, CT bei suspekten Befunden im Lymphknoten- und Abdomen-Ultraschall, Schädel-CT bei Manifestation des B-Zell-Lymphoms an Kopf und Hals, CT bzw. MRT bei Manifestation des B-Zell-Lymphoms am Bein, Lymphabstromszintigraphie zur nachfolgend histologischen Analyse des die Läsion drainierenden Lymphknotens, Fotodokumentation (Gellrich S, Hautarzt, 2000; Gellrich S, Klinikarzt, 2002).

Nach erfolgter Behandlung sollte alle 3 bis 6 Monate eine Verlaufskontrolle erfolgen, die sich auf die klinischen Aspekte der Hauterscheinungen und möglichen Lymphknotenvergrößerungen, konzentriert. Die bildgebenden Untersuchungen werden überwiegend mittels Ultraschall-Untersuchungen realisiert und nur bei begründetem Verdacht auf eine extrakutane Manifestation durch eine CT-Untersuchung ergänzt. Paraklinisch ist erfahrungsgemäß die Analyse des Differential-Blutbildes und der PCR für die IgH- und TCR-γ-Gene ausreichend, solange keine Manifestation des Lymphoms besteht.

In der Routine-PCR-Analyse der Gesamt-DNA (bulk) aus der Haut können klonale Immunglobulin-Gen Amplifikate nur in ca. 50-90% der Fälle identifiziert werden, obwohl es sich um histologisch sichere B-Zell-Lymphome handelt (Child FJ, Br J Dermatol, 2001; Child FJ, J Invest Dermatol, 2001). In einem Patienten mit FCCL wurde auf Einzelzell-Ebene das individuelle Tumorgen der schweren Kette des Immunglobulins amplifiziert, wobei in der Routinediagnostik jedoch kein klonales Amplifikat gewonnen werden konnte (Golembowski S, Immunobiol, 2000). Nach Analyse der Primer zeigte sich, daß die FR3-Region dieses Patienten so stark mutiert war, daß die Routine-Primer nicht an das Gen binden konnten (siehe auch Abschnitt 5). Die Einzelzell-Primer setzen im FR1 und in der JH-Region an. Diese Regionen sind wesentlich seltener mutiert. Diese interessante Nebenbeobachtung von Mutationen an Primerbindungsstellen dürfte ein Grund für die niedrige Effizienz der Routine-PCR darstellen (Child FJ, J Invest Dermatol. 2001)

2.1.4. Therapie kutaner B-Zell-Lymphome

Die Behandlung primär kutaner B-Zell-Lymphome orientiert sich an der guten Prognose dieser Erkrankung (Willemze R, Blood, 1997; Grange F, Ann Dermatol Venereol, 2002) Die Therapie hängt von der klinischen Manifestation, dem histologischen Befund und der Ausbreitung des Lymphoms (unilokulär, multipel, sekundär extrakutan) ab. Im folgenden sollen die derzeit akzeptierten Therapien vorgestellt werden.

2.1.4.1. Lokale Behandlung

Bei unilokulärer Manifestation eines niedrig malignen CBCL, mit einem Durchmesser kleiner 3 cm, sollte eine vollständige Exzision vorgenommen werden (Willemze R, Blood, 1997; Watsky KL, J Dermatol Surg Oncol, 1992; Zenahlik, Hautarzt, 2000).

Eine lokale Anwendung der Röntgenweichstrahltherapie (Einzeldosis 3-4 Gy, Gesamtdosis 30Gy) oder von schnellen Elektronen (Summendosis 30Gy) kann ebenfalls durchgeführt werden. Diese Therapieform eignet sich besonders in Regionen, welche einer Exzision schlecht zugänglich sind, wie z.B. bei einem Lymphom am Augenlid (Willemze R, Blood, 1997; Watsky KL, J Dermatol Surg Oncol, 1992; Zenahlik, Hautarzt, 2000).

Beide Optionen können auch kombiniert angewendet werden, indem zunächst exzidiert und anschließend bestrahlt wird.

Als lokale Chemotherapie ist die intraläsionale Gabe von Cisplatin möglich (Kempf W, Arch Dermatol, 1998). Durch diese Maßnahmen kann bei unilokulären Herden oft eine lebenslange Vollremission erreicht werden.

Eine Ausnahme bildet das großzellige B-Zell-Lymphom der unteren Extremität. Aufgrund seiner Aggressivität sollte eine Exzision kleinerer Herde erfolgen, welche mit nachfolgender Radiatio und Immuno- oder Chemotherapie kombiniert wird. Bei Befall der regionären Lymphknoten (Nachweis über sentinel lymph node biopsy) (Starz H, Cancer, 1999) empfiehlt sich auch eine Bestrahlung der Leisten- und Beckenlymphknoten der ipsilateralen Seite.

2.1.4.2. Immuntherapie

B-Zell-Lymphome der Haut, vor allem mit multiplen oder sehr großen Läsionen, können oftmals durch Exzision und Bestrahlung nicht kurativ behandelt werden. Darum können bei diesen Patienten systemische Immuntherapien eine Anwendung erfahren. Möglich sind eine kombinierte Behandlung mit Interleukin 2 und Interferon α2a subkutan (Zenone T, Eur J Cancer, 1994) oder die Gabe des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab intraläsional und / oder intravenös, bei vorherigem histologischen Nachweis von CD20+ Tumorzellen. Die Vor- und Nachteile sowie die Wirksamkeit dieser Behandlungsregimes werden derzeit in kontollierten Anwendungsbeobachtungen bei Patienten mit primär kutanem B-Zell-Lymphom erfaßt (Bonnekoh B, J Cancer Res Clin Oncol, 2002; Soda R, Acta Derm Venereol, 2001; Aboulafia DM, Am J Clin Oncol, 2001; Gellrich S, Hautarzt, 2001; Heinzerling LM, Cancer, 2000; Sabroe RA, Br J Dermatol, 2000; Heinzerling L, Arch Dermatol, 2000).

Die Immuntherapie mit dem therapeutischen Anti-CD20-Antikörper (Rituximab) Mabthera® hat Einzug in die Therapie primär kutaner B-Zell-Lymphome gehalten. Dabei zeichnen sich 2 Strategien in der Dermatologie ab:

Intravenöse Therapie

Die i.v.-Applikation von Rituximab bei Anwendung von 4 bis 8 Zyklen (Dosierung 375mg/m2/KO erfolgt 1x wöchentlich). Bei beiden Anwendungszeiträumen wurde über ein Ansprechen der Läsionen berichtet, wobei nach 8 Zyklen eine höhere Vollremissionsrate erreicht wird als nach 4 Zyklen (Bonnekoh B, J Cancer Res Clin Oncol, 2002; Soda R, Acta Derm Venereol, 2001; Aboulafia DM, Am J Clin Oncol. 2001; Gellrich S, Hautarzt. 2001; Heinzerling LM, Cancer, 2000; Sabroe RA, Br J Dermatol, 2000; Soda R, Acta Derm Venereol, 2001). Bisher gibt es jedoch lediglich Anwendungsbeobachtungen und noch keine Studien, was durch geringe Fallzahlen von primär kutanen B-Zell-Lymphomen und durch das kostenintensive Medikament bedingt ist. Es wurde ein Protokoll entwickelt, welches die gezielte Anwendungsbeobachtung erlaubt. Folgende Daten liegen bei unseren Patienten vor:

Bei 11 Patienten ist die Behandlung mit 8 Zyklen Rituximab i.v. abgeschlossen. Es haben 9/11 Patienten auf die Therapie angesprochen. Bei 7/11 Patienten konnte ein vollständiges Abheilen, bei 2/11 Patienten eine partielles Abheilen und bei 2/11 Patienten ein Fortschreiten der Hautveränderungen gesehen werden. 4/11 Patienten entwickelten bisher ein Rezidiv, wobei die rezidivfreie Zeit zwischen 1 und 24 Monaten anhielt. Ein klinisches Beispiel ist in den Abbildungen 4a und 4b dargestellt.

Abbildung 4a: *vor Therapie*

Abbildung 4b: *nach Therapie mit 8 Zyklen Rituximab*

Histologisch konnte eine komplette Remission bei 3 Patienten und eine fraglicher Nachweis von Tumorzellen bei 2 von 7 untersuchten Biopsien nach Therapie gezeigt werden.
ber die Wirksamkeit des Anti-CD20-Antikörpers bei Patienten mit großzelligem B-Zell-Lymphom der unteren Extremität gibt es widersprüchliche Erfahrungen (Bonnekoh B, J Cancer Res Clin Oncol, 2002; Aboulafia DM, Am J Clin Oncol, 2001; Heinzerling LM, Cancer, 2000). Die Autoren berichten in Einzelfalldarstellungen über ein gutes Ansprechen bei diesen Patienten. Diese Ergebnisse konnten wir jedoch bei unseren Patienten nicht bestätigen. Von 3 Patienten haben 2 Patienten ein Ansprechen gezeigt, jedoch in keinem Fall wurde eine kompletten Remission erreicht.

Intraläsionale Therapie

Die zweite Möglichkeit der Rituximab-Therapie ist die intraläsionale Gabe. Dabei wird das Medikament in und um die Läsion appliziert. Diese Therapieform ist derzeit im Gegensatz zur i.v.-Applikation nicht zugelassen. Im Rahmen individueller Heilversuche gibt es jedoch Einzelbeobachtungen, welche ein gutes Ansprechen der Läsionen dokumentieren (Heinzerling LM, Cancer, 2000; Paul T, Br J Dermatol, 2001) Derzeit wird ein Protokoll mit der EORTC-cutaneous lymphoma group entwickelt zur intraläsionalen Anwendung dieses Medikamentes im Rahmen einer internationalen Studie.
In der wissenschaftlichen Erprobung sind weiterhin Immuntherapien im Rahmen von Vakzinierungsstrategien. Bei anderen Malignomen, z.B. Melanom (Hipp JD, In Vivo, 2000) und Nierenzell-Karzinom (Holtl L, J Urol, 1999) aber auch bei systemischen Non-Hodgkin-Lymphomen liegen bereits positive Erfahrungen vor. (Hawkins RE, Blood, 1994).

2.1.4.3. Systemische Therapie

Eine Assoziation kutaner B-Zell-Lymphome mit *Borrelia burgdorferi*-Infektionen wurde beschrieben, so daß bei positivem IgG- oder IgM-Titer immer eine Behandlung mit Ceftriaxon (2g/d i.v. über 2 Wochen) erfolgen sollte. Unter einer antibiotischen Therapie wurden Regressionen beobachtet (Cerroni L, J Cutan Pathol, 1997; Zenahlik P, Hautarzt, 2000).
Auch über die Wirksamkeit einer lokalen antiviralen Therapie mit Aciclovir in Kombination mit einer Reduzierung der Immunsuppression nach Transplantation wurde berichtet (Mozzanica N, J Heart Lung Transplant, 1997)
Problematisch bei der Behandlung primär kutaner B-Zell-Lymphome stellen sich multiple Läsionen, eine sekundär extrakutane Beteiligung sowie besonders die Manifestation des seltenen, prognostisch ungünstigen großzelligen B-Zell-Lymphoms der unteren Extremität dar. Diese können durch die bisher genannten Therapiemodalitäten nur schlecht beeinflußt werden.
Exzision und Radiotherapie sollten nach Möglichkeit angewendet werden, führen jedoch nicht zur Vollremission. Eine Chemotherapie (6 Zyklen CHOP, COP, MACOP) kann zur Regression (PR, CR) des Befundes führen (Watsky KL, J Dermatol Surg Oncol, 1992; Nagatani T, J Dermatol, 1993; Rijlaarsdam JU, J Clin Oncol, 1996) und sollte unter nachfolgender Anwendung von Interferon α2a (3x 3 Mio IE pro Woche) oder Anti-CD20-Antikörper als Erhaltungstherapie stabilisiert werden. Neuste Ergebnisse zeigen ein 100% Ansprechen und eine länger anhaltende Remission von Patienten mit nodalen non-Hodgkin-B-Zell-Lymphomen nach einer kombinierten CHOP- Rituximab-Chemoimmunotherapie (Portlock CS, Curr Oncol Rep 2002; Akhtar S, N Engl J Med, 2002). Dieses

Therapieschema sollte vor allem auch für die Behandlung der aggressiveren großzelligen B-Zell-Lymphome der unteren Extremität in Erwägung angewendet werden.
Im Stadium III/IV mit extrakutaner Beteiligung sollte auch eine autologe Knochenmarktransplantation in Erwägung gezogen werden. Die positiven Erfahrungen bei nichtkutanen non-Hodgkin-Lymphomen, existieren für primär kutane B-Zell-Lymphome derzeit nicht.

2.2. Klassifikation, Histologie und Klinik primär kutaner T-Zell-Lymphome (CTCL)

Die EORTC-Klassifikation der primär kutanen T-Zell-Lymphome erfolgt ebenfalls entsprechend dem klinischen Verlauf und soll im folgenden dargestellt werden:

Tabelle II: *EORTC-Klassifikation für primär kutane T-Zell-Lymphome(CTCL)*
(Willemze R, Blood, 1997)

Verlauf	Histologische Entität	Häufigste Lokalisation
indolent	• Mykosis fungoides (MF) • Mykosis fungoides mit Mucinosis follicularis • Pagetoide Retikulose (PR) • Großzelliges CD30+T-Zell-Lymphom (CD30+LTCL) • Lymphomatoide Papulose (LyP)	• Innenseiten der Extremitäten, seitlicher Stamm, Kopf • Extremitäten • Keine • keine
aggressiv	• Sézary-Syndrom (SS) • Großzelliges CD30- Lymphom (CD30-LTCL)	• gesamtes Integument • keine
provisorisch	• Granulomatous slack skin • klein-bis mittelgroßzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphome (smpTCL) • Subkutanes pannikulitis like Lymphom	• keine • keine • keine

Nur die relevanten Entitäten, vor allem in Bezug auf die publizierten Arbeiten, werden etwas detailierter dargestellt.

2.2.1. Mykosis fungoides (MF)

Die häufigste lymphoproliferative T-Zell-Erkrankung der Haut ist die Mykosis fungoides. Die Erstbeschreiber waren Alibert und Bazin (Alibert JLM, Barriois l'Aîné et Fils, 1806) , welche die Erkankung entsprechend dem klinischen Erscheinungsbild bezeichneten: nämlich dem pilzartigen Aufschießen von Tumoren, der „pilzartigen Pilzerkrankung".
Die Erkrankung verläuft in 3 klinischen Stadien. Die Hautveränderungen der 3 Stadien können nebeneinander bestehen:
<u>Ekzemstadium:</u> Atrophische Makeln mit pityriasiformer Schuppung an Oberarm- und Oberschenkelinnenseiten sowie am seitlichen Stamm dominieren und sind teilweise mit Juckreiz verbunden. Die Abgrenzung zur Parapsoriasis en plaques (Pep) kann schwierig sein, wobei heute ein

Übergang der großfleckigen Pep in eine MF für möglich gehalten wird. Einige Patienten können mit einer MF im Ekzemstadium viele Jahre leben, ohne daß ein wesentlicher Progreß der Erkankung beobachtet wird. Bei anderen Patienten treten nach Monaten bis Jahren zusätzlich Plaques und Tumoren auf (Abbildung 5a).

Plaquestadium: Die ekzematösen Herde sind durch zunehmende Infiltrationen gekennzeichnet. Es treten Plaques mit Schuppung, selten mit Erosionen auf. Eine Lymphknotenbeteiligung durch die Tumorzellen ist möglich (Abbildung 5b).

Tumorstadium: Die Manifestation von Tumoren tritt in der Regel erst nach jahrelanger Krankheit auf (Abbildung 5c).

Es gibt jedoch eine Manifestationsform der MF (Mycosis fungoides d' emblée), bei welcher schon zu Beginn der Erkrankung Tumoren dominieren. Diese Sonderform wird heute als pleomorphes oder anaplastisches Lymphom diagnostiziert.

Als weitere Sonderform ist die Mucinosis follicularis bei Mykosis fungoides zu werten. Hier ist eine Zerstörung von Haarfollikeln durch die infiltrierenden Tumorzellen zu beobachten und damit klinisch eine Alopezie in den betroffenen Arealen sichtbar.

Die Einteilung der MF nach der TNM-Klassifikation wird insbesondere für die Beurteilung von Ergebnissen in Studien verwendet, ist jedoch aus klinischer Sicht umstritten, da sowohl der quantitativen Erfassung der Tumoren als auch dem rezidivierenden Auftreten der Hautveränderungen nur ungenügend Rechnung getragen wird.

Tabelle III: *TNM-Staging der Mykosis fungoides*

Stadium	**TNM**	**Klinik**
IA	pT1 N0 M0	Ekzem, Plaque<10%KO
IB	pT2 N0 M0	Ekzem, Plaque>10%KO
IIA	pT1-2 N1 M0	Ekzem, Plaque, LK-Vergrößerung ohne Lymphomnachweis
IIB	pT3 N0-1 M0	Ekzem, Plaque, Tumor
III	pT4 N0-1 M0	Erythrodermie, kein Lymphomnachweis im Lymphknoten
IVA	pT1-4 N2-3 M0	Ekzem, Plaque, Tumor, Nachweis von Lymphomzellen im LK
IVB	pT1-4 N0-3 M1	Ekzem, Plaque, Tumor, Nachweis von Lymphomzellen im LK möglich, Organbefall

Histologisch ist im Stadium des Ekzems der Mykosis fungoides ein perivaskuläres bis bandförmig konfluierendes, subepidermales Infiltrat zu sehen. Die Tumorzellen sind pleomorphe CD3+, CD4+, CD8-, CD45R0-, CD30- T-Lymphozyten mit zeribriformem Zellkern. Untermischt ist das Infiltrat von CD3+, CD8+ Lymphozyten, Histiozyten, Eosinophilen und Plasmazellen.

Im Plaquestadium nimmt das subepidermale Infiltrat zu. Charakterisitisch ist das Aufsteigen von Tumorzellen in die Epidermis. Solche gruppiert angeordneten, intraepidermalen Lymphozyten werden als Pautrier'sche Mikroabszesse bezeichnet und sind im Falle des Auftretens wegweisend für die Diagnose (Abbildung 5d). Das Tumorstadium ist histologisch durch ein Überwiegen der pleomorphen, jetzt teils anaplastischen Tumorzellen im zunehmenden dermalen Infiltrat gekennzeichnet. Klinisch

korreliert die Ansammlung der Tumorzellen mit der Entstehung von Knoten, welche oberflächlich exulzeriert sein können. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 kann verloren gehen. Zusätzlich kann das CD30-Molekül exprimiert werden, was bei der MF als prognostisch ungünstig gilt. (Willemze R, Blood, 1997)

Je weiter die Erkrankung fortgeschritten ist, umso häufiger läßt sich molekularbiologisch ein klonales T-Zell-Rezeptor (TCR)-γ- oder TCR-ß- Gen nachweisen (Whittaker S, Curr Top Pathol, 2001; Lukowsky A, Hautarzt, 1998). Läßt sich in Haut und Blut ein identischer T-Zell-Klon zu Beginn der Erkankung nachweisen, spricht das für eine schlechtere Prognose eines kutanen T-Zell-Lymphoms (Beylot-Barry M, J Invest Dermatol, 2001).

Abbildung 5a: *Mykosis fungoides, Ekzemstadium*

Abbildung 5b: *Mykosis fungoides Plaquestadium*

Abbildung 5c*: Mykosis fungoides, Tumorstadium*

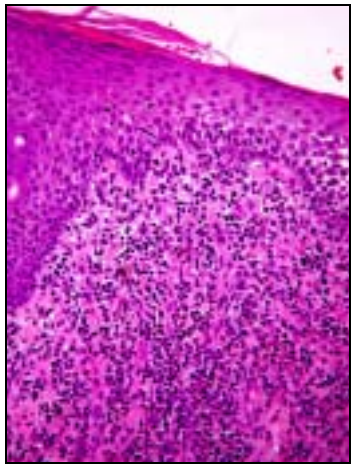


Abbildung 5d: *Mykosis fungoides, HE 20x*

2.2.2. Pagetoide Retikulose (PR)

Diese Erkrankung, auch als epidermale Variante der MF bezeichnet, schreitet sehr langsam ohne die Beteiligung extrakutaner Organe fort und hat eine ausgezeichnete Prognose. Klinisch wird der lokalisierte Typ (Woringer-Kolopp) vom disseminierten Typ (Ketron-Goodman) unterschieden.

Histologisch dominiert eine Akanthose, eine spongiotische Epidermis mit großen, atypischen pagetoiden Zellen, welche einzeln oder in Nestern angeordnet sind. Immunphänotypisch stellen sie sich CD3+, CD4+, CD8- oder CD3+, CD4-, CD8+ dar. CD30 kann exprimiert werden. Ein klonales Rearrangement für das TCR-γ-Gen kann meist nachgewiesen werden (Willemze R, Blood, 1997).

2.2.3. CD30+ großzelliges Lymphom (CD30+LTCL)

In der EORTC-Klassifikation für kutane Lymphome stellt dieses Lymphom eine Entität dar. Die 5-Jahres-Überlebenszeit beträgt 90% und ist damit wesentlich besser als bei den CD30- großzelligen T-Zell-Lymphomen der Haut oder auch bei den CD30+ extrakutanen Lymphomen (Willemze R, Blood, 1997).

Klinisch manifestieren sich die Läsionen unabhängig von der Zellmorphologie (anaplastisch, immunoblastisch, pleomorph) als einzelne oder multiple Knoten oder Tumoren, welche oberflächlich erodiert sein können (Abbildung 6a).

Histologisch ist das Infiltrat durch große Zellen mit rundem bis ovalen, irregulär eingekerbtem Kern und prominentem Nukleolus charakterisiert. Die Tumorzellen exprimieren mehrheitlich das CD30-Antigen und zeigen meistens den Verlust einzelner oder aller Pan-T-Zell-Marker (CD2, CD3, CD5) (Abbildung 6b). Fast immer wird ein klonales TCR-γ-Gen nachgewiesen (Willemze R, Blood, 1997).

Es gibt jedoch auch CD30+ Grenzfälle, so daß eine Unterscheidung zwischen CD30+LTCL und LyP schwierig sein kann. Nur bei Berücksichtigung des klinischen Erscheinungsbildes und des Verlaufs ist die Diagnose eindeutig zu stellen.

Abbildung 6a: *CD30+ großzelliges T-Zell-Lymphom*

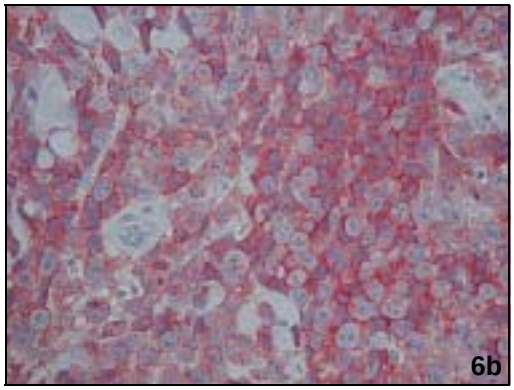


Abbildung 6b: *CD30+ großzelliges T-Zell-Lymphom, Anti-CD30-Färbung, 40x*

2.2.4. Lymphomatoide Papulose (LyP)

Die Lymphomatoide Papulose ist eine niedrig maligne lymphoproliferative Erkrankung der Haut, die histologisch ähnliche Merkmale aufweist wie einige kutane T-Zell-Lymphome oder die kutane Hodgkin-Erkrankung. In 10-20% der Fälle ist sie mit der Manifestation von weiteren lymphatischen Neoplasien wie dem Morbus Hodgkin, dem CD30+ großzelligen Lymphom der Lymphknoten oder der Mykosis fungoides assoziiert (Basarab T, Br-J-Dermatol, 1998; Christensen HK, Semin-Dermatol. 1994; Bekkenk MW, Blood. 2000; Davis TH, N Engl J Med, 1992; el-Azhary RA, J Am Acad Dermatol, 1994; Whittaker S, J Invest Dermatol, 1991; Wood GS, J Invest Dermatol, 1995; Wang HH, Cancer, 1999; Chott A, J Invest Dermatol, 1996)

Klinisch fallen papulöse, noduläre, teils nekrotische Läsionen auf, welche im Verlauf von 3 bis 6 Wochen spontan unter Zurückbleiben einer bräunlichen Hyperpigmentierung narbig abheilen. (Gellrich S, H&G, 1998), Die typischen Effloreszenzen sind beim Erwachsenen überwiegend jedoch generalisiert angeordnet, nur selten sind sie solitär oder auf einzelne Regionen beschränkt (Abbildung 7a). Bei Kindern bleiben die Eruptionen über einen langen Zeitraum lokal begrenzt ohne Neigung zur Generalisation (Van Neer FJ, Br J Dermatol, 2001). Das Allgemeinbefinden der Patienten ist nicht

beeinträchtigt. Juckreiz besteht nur in Ausnahmefällen. Histologisch werden 3 Typen der Lymphomatoiden Papulose unterschieden (Willemze R, Blood, 1997):

Typ A: In ein entzündliches Infiltrat (Lymphozyten, Histiozyten, Neutrophile, Eosinophile) sind einige nestförmig angeordnete atypische CD30+ Lymphozyten eingestreut. Die Epidermis ist gewöhnlich nicht durch atypische Lymphozyten infiltriert, jedoch kann sie neutrophile Granulozyten enthalten. Spontane oberflächliche Ulzerationen kommen vor, die Proliferationsrate im Infiltrat ist typischerweise hoch (Abbildung 7b)**. Typ B:** Es wird ein perivaskuläres und ein bandförmig im oberen Korium konfluierendes dermales Infiltrat gefunden, wobei vor allem kleine CD3+, CD30- Lymphozyten mit einem gelappten Kern dominieren. Große CD30+ T-Zellen kommen häufig, aber nicht obligat vor. Eosinophile und Neutrophile werden kaum gefunden. Mitosen sind seltener als bei der lymphomatoiden Papulose Typ A. Dieser Befund ähnelt dem des Plaquestadiums der Mycosis fungoides, weshalb die Differentialdiagnose schwierig sein kann. Typ A- und Typ B-Muster können in einer Läsion gleichzeitig gefunden werden. **Typ C:** Ein monomorphes Infiltrat aus großen Clustern atypischer CD30+ Zellen mit wenigen eingestreuten “Entzündungszellen” wird beobachtet. Der Befund entspricht dem des kutanen CD30+ pleomorphen T-Zell-Lymphoms.

Molekularbiologisch ist in Gewebeproben bei etwa der Hälfte der Patienten eine klonale Expansion von T-Lymphozyten nachweisbar. Bei einigen Patienten kann die Persistenz des Klons auch während des Übergangs in ein anderes T-Zell-Lymphom beobachtet werden (Davis TH, N Engl J Med, 1992; el-Azhary RA, J Am Acad Dermatol, 1994; Whittaker S, J Invest Dermatol, 1991; Wood GS, J Invest Dermatol, 1995; Chott A, J Invest Dermatol, 1996).

Differentialdiagnostisch sind andere maligne Lymphome, besonders das anaplastische großzellige CD30-positive T-Zell-Lymphom beim Typ C der Lymphomatoiden Papulose (el-Azhary RA, J Am Acad Dermatol, 1994), die Mycosis fungoides im Plaquestadium beim Typ B der lymphomatoiden Papulose, die akute und chronische Form der Pityriasis lichenoides (Rogers M, Semin Dermatol, 1992), das syphilitische Exanthem, die disseminierte Arthropodenreaktion (Smoller BR, Mod Pathol, 1992), die Histiozytosis X und das papulonekrotische Tuberkuloid abzugrenzen.

Abbildung 7a: *Lymphomatoide Papulose*

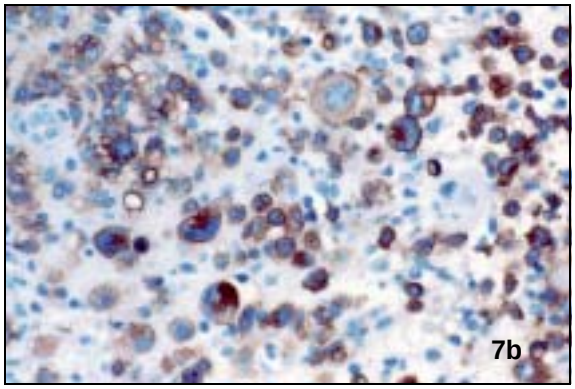


Abbildung 7b: *Lymphomatoide Papulose, Typ A Anti-CD30-Färbung, 40x*

2.2.5. Sézary-Syndrom (SS)

Das SS ist eine mit Juckreiz, Erythrodermie und generalisierter Lymphadenopathie einhergehende Dermatose, welche durch das Vorhandensein von malignen T-Zellen in Haut, Lymphknoten und peripherem Blut (Leukozytose, Lymphozytose, PAS+Sézary-Zellen > 1000 /mm^3) gekennzeichnet ist. An der Haut sind zusätzlich eine Alopezie, Onychdystrophie und palmoplantare Hyperkeratosen zu

finden (Abbildung 8a, 8b). Die Lymphadenopathie ist zunächst unspezifisch, später werden die Lymphknoten durch maligne Zellen zerstört, welche einige ihrer T-Zell-Antigene durch die Transformation verloren haben. Das Manifestationsalter liegt bei über 40 Jahren. Die Erkrankung hat eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres –Überlebensrate von 11% (Willemze R, Blood, 1997)

Der histologische Befund ähnelt dem der MF, wobei die zellulären Infiltrate beim SS eintöniger aussehen. Der Epidermotropismus kann fehlen. Infiltrierte Lymphknoten zeigen ein dichtes monotones Infiltrat von Sézary-Zellen bei verlorengegangener Lymphknotenarchitektur. Immunphenotypisierung: CD3+, CD4+, CD45R0+, CD8-, CD30-

Molekularbiologie: TCR-β- und / oder -γ-Gene sind klonal rearrangiert (Abbildung 8c).

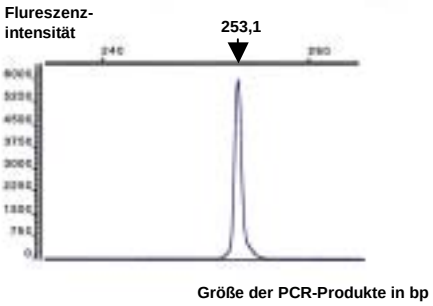


Abbildung 8a, 8b: *Sézary-Syndrom, Erythrodermie, Hyperkeratose der Hände*

Abbildung 8c: *klonales TCR-γ- Rearrangement, FFA-Analyse*

2.2.6. Diagnostik und Verlaufskontrolle primär kutaner T-Zell-Lymphome

Wie bei den primär kutanen B-Zell-Lymphomen ist der Ausschluß einer internen Manifestation des Lymphoms Voraussetzung zur Klassifikation primär kutaner T-Zell-Lymphome. Dafür wird folgende Diagnostik durchgeführt: Erfassung von B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust), Blutuntersuchungen (Differential-Blutbild, FACS, PCR für das TCR-γ-Gen, LDH Parameter für Leber und Niere, Entzündungsparameter), Röntgen-Thorax, Ultraschall des Abdomens, der cervikalen, axillären und inguinalen Lymphknotenregionen, CT bei suspekten Befunden im Lymphknoten- und Ultraschall des Abdomens, Schädel-CT bei Manifestation des T-Zell-Lymphoms an Kopf und Hals, ggf. Lymphabstromszintigraphie zur nachfolgend histologischen Analyse des die Läsion drainierenden Lymphknotens, Fotodokumentation.

Nach erfolgter Behandlung sollte alle 6 Monate eine Verlaufskontrolle erfolgen, die sich auf die klinischen Aspekte, die Manifestation an der Haut und einen möglichen Lymphknotenbefall, konzentriert. Die bildgebenden Untersuchungen werden überwiegend mittels Ultraschall-Untersuchungen realisiert und nur bei begründetem Verdacht auf eine extrakutane Manifestation wird ein CT angeschlossen. Paraklinisch ist erfahrungsgemäß die Analyse des Differential-Blutbildes und der PCR für das TCR-γ-Gen ausreichend, solange keine zusätzlichen Beschwerden zum Hautbefall des Lymphoms bestehen.

Klonalität für das TCR-γ-Gen ist in Zusammenschau mit der Histologie ein zusätzlicher diagnostischer Hinweis für das Bestehen eines T-Zell-Lymphoms (Muche JM, Blood. 1997). Dafür wird genomische Gesamt-DNA (bulk) aus einem Teil des Bioptates gewonnen. Es erfolgt die Amplifikation mit Primern für den variablen Teil des TCR-γ-Gens. Das PCR-Produkt kann in der Temperaturgradienten-Gel-

Elektrophorese (TGGE) über eine Gelelektrophorese mit Temperaturgradienten oder über eine Fluoreszenz-Fragment-Analyse (FFA) in einem kapillarelektrophoretischen Verfahren detektiert werden. Als klonal gelten scharf abgegrenzte Banden in der TGGE bzw. ein dominiertender Peak in der FFA. Für den T-Zell-Rezeptor-β können analoge Nachweise geführt werden, wobei diese sehr aufwendig in der Routinediagnostik sind und darum nur in besonderen Fällen angewendet werden (Whittaker S, Curr Top Pathol, 2001; Lukowsky A, Hautarzt, 1998, Ahnhudt C; Electrophoresis, 2001).

2.2.7. Therapie primär kutaner T-Zell-Lymphome

Die Therapie primär kutaner T-Zell-Lymphome ist vielfältig. Sie richtet sich vor allem nach der Prognose, welche sehr unterschiedlich sein kann (Vonderheid EC, Recent Results Cancer Res, 2002).

2.2.7.1. Lokale Therapie

Manifestiert sich ein primär kutanes T-Zell-Lymphom als solitärer, kleiner Herd, steht die Exzision aus diagnostischer und therapeutischer Sicht an erster Stelle. Häufig kann dadurch die komplette Remission (CR) dauerhaft erreicht werden, z.B. bei großzelligen CD30+ T-Zell-Lymphomen oder klein- bis mittelgroßzelligen pleomorphen T-Zell-Lymphomen.

Die Mykosis fungoides und das Sézary-Syndrom sind in der Regel schon zu Beginn der Erkrankung generalisiert, so daß hier nur eine diagnostische Exzision in Frage kommt. Therapeutisch können bei diesen beiden Erkrankungen topische Anwendungen (Steroide, Mechlorethamin und Carmustin) zu einer Besserung der Symptomatik führen.

Topische Glucokortikoide (Klasse II-IV) führen in 60% der Patienten mit MF im Stadium IA zu einer CR (Zackheim, Arch Dermatol,1998). In fortgeschrittenen Stadien können topische Glukokortikoide nur noch als unterstützende Therapieoption angesehen werden.

Mechlorethamin (Nitrogen Mustard®) und BCNU (Carmustine®) sind lokal applizierbare Zytostatika. Sie können bei Patienten mit CTCL, Stadium I-III angewendet werden und führen zu einer CR bei 49% bis 80% der Patienten (Vonderheid EC, J Am Acad Dermatol, 1989; Zackheim HS, J Am Acad Dermatol, 1990). Unerwünschte Wirkungen sind in 35% bis 67% der Patienten u.a. eine Typ IV-Allergie (kontaktallergische Dermatitis) sowie Spinaliome, Basaliome, Hodgkin-Lymphome und Kolon-Karzinome (Vonderheid EC, J Am Acad Dermatol, 1989). Obwohl hohe Ansprechraten erreicht werden, führen jedoch die umständliche Applikation und die möglichen angegebenen Nebenwirkungen zu einer seltenen Anwendung im europäischen Raum.

Als nächste Therapieoption besteht die Möglichkeit einer lokalen Bestrahlung mit Röntgenweichstrahlen oder schnellen Elektronen (Gesamtdosis 30 bis 40Gy, Fraktionen von 2-4Gy), was besonders beim Auftreten von einzelnen Hauttumoren und als Nachbestrahlung bei erfolgter Exzision angewendet wird. Obwohl bei einigen CTCL, z.B. CD30+großzellige CTCL, eine dauerhafte CR mit diesem Verfahren erreicht werden kann, wird die lokale Bestrahlung vor allem bei Patienten mit MF als zusätzliche Maßnahme verwendet, wenn auftretende Tumore therapieresistent gegenüber den Standardtherapien (PUVA, IFN2a) sind.

Die Ganzkörperbestrahlung mit schnellen Elektronen kann zu einer langandauernden CR (50% der Patienten sind innerhalb von 10 Jahren rezidivfrei) führen, wobei die besten Ansprechraten im

Stadium IA mit 90% erreicht werden. In höheren Stadien (IB bis III) wird die Ansprechrate mit 64% bis 71% angegeben (Hoppe RT, Cancer Treat Rep, 1979). Problematisch sind die technische Ausführung der Ganzkörperbestrahlung (überlappende Bestrahlungsfelder, verdeckte Hautareale) und die Nebenwirkungen (Alopecia totalis, Anhidrosis, Xerosis cutis).

2.2.7.2. UV-Exposition

Dieses Verfahren wird auch als Photochemotherapie oder **P-UVA** bezeichnet, weil zunächst ein photosensiblisierendes Medikament (8-Methoxypsoralen = **P**) mittels Bad, Creme oder durch orale Einnahme auf die Haut einwirken kann und im zweiten Schritt der Patient mit **UVA** exponiert wird. Dabei können sowohl lokale als auch systemische und immunologische Effekte erreicht werden. Auch die Anwendung von UVB ist möglich. Eine Modifikation stellt die extrakorporale Photopherese (ECP) dar, bei welcher separierte Leukozyten aus dem Blut mit UVA bestrahlt und anschließend reperfundiert werden. Ein Risiko bei systemischer Anwendung wird in der Entstehung von Spinaliomen, Katarakt und Amyloidose gesehen.

Die hier kurz vorgestellte P-UVA gehört zu den Standardtherapien des CTCL. Besonders in frühen Stadien (IA bis IIA) können CR von 90% erreicht werden. In späteren Stadien können andere Therapien, z.B. IFN2a, mit der Lichttherapie kombiniert werden. Die rezidivfreie Zeit beträgt statistisch 11-14 Monate. (Herrmann JJ, J Am Acad Dermatol, 1995).

Bei der ECP handelt es sich um eine kostenintensive Langzeittherapie (Knobler R, Blood, 2000; Oliven A, Blood-Rev, 2001). Sie ist den erythrodermischen Stadien vorbehalten (MF und Sezary-Syndrom). Die Ansprechrate ist höher, wenn die Leukozytenzahlen < 15 000 /ml sind und ein normaler Anteil CD8+ T-Lymphozyten im peripheren Blut nachweisbar ist (Edelson RL, Ann N Y Acad Sci, 1991). Die ECP kann eine spezifische Immunantwort gegen maligne T-Zellen induzieren. Weitere Effekte wie z.B. lymphozytotoxische Wirkungen und DNA-Zerstörung unter UVA-Exposition unterstützen die Tumorreduktion. Einerseits wird eine Änderung der Tumor-Immunogenität und andererseits eine Aktivierung des Immunsystems (zytotoxische T-Zellen, Monozyten) vermutet. Letztendlich ist der Mechanismus der ECP-Wirksamkeit nicht geklärt (Marks DI, J Clin Invest, 1990; Edelson RL, Ann N Y Acad Sci, 1991).

2.2.7.3. Kombination verschiedener Therapieverfahren

Der Synergismus verschiedener Therapien kann bei der Behandlung von CTCL-Patienten ausgenutzt werden. Die Standardtherapie für die Stadien IA bis IIA ist die Kombination von PUVA und IFNα2a (Kuzel TM, J Clin Oncol, 1995). Dabei können Ansprechraten von ca. 80% (CR70%) erreicht werden, was in einer einzigen prospektiv randomisierten Studie gezeigt wurde (Stadler R, Blood, 1998). Zusätzlich kann eine lokale Bestrahlung mit Röntgenweichstrahlen oder schnellen Elektronen eine Tumorregredienz bewirken. Die Kombination PUVA + IFNα2a kann mit einer Retinoidapplikation erweitert werden. Retinoide werden auch mit der ECP kombiniert.

2.2.7.4. Modulatoren des Immunsystems

Immunmodulatoren sind Medikamente, welche angelehnt an physiologische Reaktionsweisen, zu einer Verstärkung des Immunsystems führen, z.B. zu Hemmung der Virusreplikation, Beeinflussung

der zellulären Proteinproduktion und direkte antiproliferative Effekte bewirken. Für die Behandlung von CTCL ist die Anwendung von Interferon α2a zur Standardtherapie geworden. Bei initialer Einzeltherapie (3x 9 Mio IE pro Woche) werden Ansprechraten von 55% (CR17%) erreicht mit einer Remissionsdauer von 4 bis 8 Monaten. Häufig wird diese Therapie mit der PUVA kombiniert. Nebenwirkungen bestehen in Fieber, Schüttelfrost und in seltenen Fällen in Erhöhung der Transaminasen und Depressionen (Olsen EA, Hematol Oncol Clin North Am, 1995).
Grundlage für die Wirksamkeit von IFNα2a ist die Änderung des Zytokinmusters. In CTCL dominieren TH2-Zytokine, welche durch Anwendung von IFNα2a zu einem TH1-Zytokinmuster verändert werden. Dabei können TH1-produzierende zytotoxische T-Zellen die TH2-produzierenden Tumorzellen vernichten, wobei eine Tumorlyse unter Zusatz von IL12 und IFNα in vitro bestätigt werden konnte (Seo N, Clin Exp Immunol, 1998).

2.2.7.5. Fusionsproteine

Mit Fusionsproteinen verbinden sich gentechnisch hergestellte Medikamente, welche Rezeptoren auf der Oberfläche maligner Zellen erkennen, jedoch so verändert sind, daß sie zur Zerstörung der gebunden Zelle führen.
Für die CTCL wird derzeit das DAB389IL2 angewendet, wobei im Moment nur eine vorläufige Zulassung der amerikanischen Behörde (FDA) besteht. Es handelt sich um ein Interleukin2-Diphtherie-Fusionsprotein (LeMaistre CF, Clin Lymphoma, 2000; Duvic M, Clin Lymphoma, 2000). Da ca. 20% der Patienten mit primär kutanem T-Zell Lymphom den hochaffinen IL2-Rezeptor (CD25) in der Tumorzelle überexprimieren, kann das Medikament über diesen Rezeptor an die Tumorzelle binden. Nach Internalisation zerstört das Diphtherietoxin die Tumorzelle. Erste Berichte zeigen eine Ansprechrate von 31% (CR17%). Die Nebenwirkungen ergeben sich aus der Aktivierung des Immunsystems, z.B. Syndrom der durchlässigen Gefäße und Fieber (Talpur R, Leuk Lymphoma, 2002; LeMaistre CF, Clin Lymphoma, 2000; Duvic M, Clin Lymphoma, 2000). Derzeit wird das Medikament in einer internationalen Zulassungsstudie für die Anwendung bei CTCL-Patienten geprüft.
Weitere therapeutische Antikörper können potentiell zur Therapie primär kutaner T-Zell-Lymphome eingesetzt werden, z.B. Campath, der Anti-CD52-Antikörper (Stadler-R, nicht publiziert).
Eine weitere Möglichkeit wurde in Gemeinschaftsarbeit mit der Arbeitsgruppe Hombach et al. entwickelt. Hierbei wurden autologe CD8+ zytotoxische T-Zellen eines Patienten, welcher an einem primär kutanen CD30+ T-Zell-Lymphom erkrankt war, retroviral mit einem rekombinanten Konstrukt (anti-CD30-scFv-g Rezeptor) transfiziert. Der Antikörperteil des Konstruktes, welcher das CD30-Molekül binden kann, erkennt die CD30+ Tumorzelle und löst über den benachbarten konstanten Teil des T-Zell-Rezeptors eine zytotoxische Reaktion der transfizierten CD8+ T-Zelle aus.
In vitro konnte bei gemeinsamer Kultivierung von CD30+ Tumorzellen und autologen transfizierten CD8+ T-Zellen (anti-CD30-scFv-g Rezeptor) die Abtötung von Tumorzellen des Patienten nachgewiesen werden. Zur Kontrolle dieses Ansatzes wurden autologe transfizierte zytotoxische T-Zellen eingesetzt mit einem Erkennungssegment für Colon-embryonales Antigen (CEA) im Konstrukt. In diesem Experiment wurde das Tumorzellwachstum durch die autologen transfizierten zytotoxischen T-Zellen (anti-CEA-scFv-g Rezeptor) nicht beeinflusst. Dieser Ansatz stellt möglicherweise eine neue Möglichkeit zur Therapie von CD30+ Lymphomen dar (Hombach A, Gene Ther, 2001).

2.2.7.6. Tumorspezifische Peptidvakzinierungen

In einem kompetenten Immunsystem werden mailgne Zellen bereits bei ihrer Entstehung erkannt und beseitigt. Dafür stehen dem Organismus verschiedene Abwehrmöglichkeiten zur Verfügung, z.B. die Erkennung von Peptiden an der Oberfläche potentieller Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten. Demzufolge ist die Entstehung maligner Zellen ein seltenes Ereignis, bei welchem die physiologischen Tumorabwehrmechanismen in einem eigentlichen immunkompetenten System überwunden werden. Wissenschaftliche therapieorientierte Ansätze konzentrieren sich auf die Erhöhung der Immunogenität der Tumorzelle oder auf die Stärkung der Tumorabwehr.

Eine Strategie, welche in unserer Klinik in der Arbeitsgruppe Peter Walden / Wolfram Sterry verfolgt wurde, ist die Identifizierung von tumorassoziierten Peptiden. Steht ausreichend Tumormaterial zur Verfügung, können Peptide direkt aus dem Tumor isoliert und sequenziert werden. Bei den primär kutanen T-Zell-Lymphomen ist dieser individuelle Weg jedoch die Ausnahme, da in der Regel nur wenige Tumorzellen zur Verfügung stehen.

Auf der Suche nach Tumorantigenen, welche bei vielen Patienten relevant sind, wurde eine Targetzellinie mit Peptiden beladen und zusammen mit zytotoxischen T-Zellen kultiviert.

Zur Simulation von tumorrelevanten Peptiden wurde eine Peptid-Bibliothek aus Nonapeptiden systematisch durchgetestet, wobei einzelne Positionen im Nonapeptid verändert wurden. Als zytotoxische T-Zellen wurden CD8+ T-Lymphozyten von Patienten mit primär kutanen T-Zell-Lymphomen verwendet. Bei Beladung der Targetzellen mit relevanten Nonapeptiden kann die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen mittels Interferon-γ-Assay gemessen werden. Diese Interaktion war HLA-B8 restringiert. Letztendlich konnten aus $3x10^9$ Peptiden der Bibliothek 3 relevante Peptide isoliert werden (Linnemann T, Eur J Immunol. 2001; Linnemann T, Ann Oncol. 2000). In den Experimenten konnte in 14/16 Patienten mit primär kutanem T-Zell-Lymphom, jedoch nur in 2/9 Gesunden eine Aktivierung der spezifischen CD8+ T-Lymphozyten des peripheren Blutes erreicht werden (Linnemann T, Eur J Immunol. 2001; Linnemann T, Ann Oncol. 2000).

Weil diese künstlich synthetisierten Peptide offensichtlich natürliche tumorassoziierte Peptide nachahmen, wurde ein neuer Begriff aus den Worten „Mimic“ und „Epitope“ kreiert, nämlich „Mimotope“.

Zwei der Nonapeptide konnten im individuellen Heilversuch bei 2 Patienten mit primär kutanen T-Zell-Lymphom (Mykosis fungoides und CD30+ großzelliges Lympom) eingesetzt werden. Zusätzlich erfolgte eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen durch das Auslösen einer Typ IV-Reaktion mit positiv reagierenden Antigenen des Multitest-Merieux. In beiden Fällen konnte ein Ansprechen der Patienten beobachtet werden, wobei die Hautveränderungen zunächst komplett regredient waren. Im peripheren Blut dieser Patienten konnten CD8+ mimotopspezifische zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Einer der beiden Patienten entwickelte ein Rezidiv und verstarb später an einem zweiten aggressiven Rezidiv der Erkrankung. Obwohl die Tumorerkrankung im Endstadium sehr schnell progredient war, konnten die mimotopspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten die Tumorzellen im in vitro Experiment abtöten. (Sherev and Gellrich submitted, in revision)

Sowohl in vivo als in vitro konnte eine effektive Antitumorantwort mit Mimotopen nachgewiesen werden, welche in strenger Restriktion zum HLA-B8 Molekül erfolgte. Die Therapie mit Mimotopen war mit geringen Nebenwirkungen beim Patienten verbunden, z.B. Entzündungsreaktion der Läsionen und

in der Umgebung des Applikationsortes. Mit der Verwendung von Mimotopen wird ein ganzes Repertoire von T-Zellen angesprochen, welche primär nicht tumorassoziert waren. Die Aktivierung dieser Zellen ermöglicht jedoch eine intensivierte Antitumorantwort. Die Schwankungen im Nachweis der mimotopspezifischen T-Zellen aus dem Blut können möglicherweise durch das Auswandern dieser Zellen aus dem Blut in die Hautläsionen erklärt werden.
Es konnte somit auch am Patienten gezeigt werden, daß Mimotope natürliche Tumorantigene nachahmen können und damit die Anzahl von tumorreaktiven T-Zellen erhöhen und eine effektive Antitumorantwort auslösen können. Zur Erlangung eines langanhaltenden Effektes sollten in Zukunft unterschiedliche Mimotope verwendet werden, um weitere Populationen zytotoxischer spezifischer T-Lymphozyten zu aquirieren.
Im Gegensatz zu den Melanompatienten konnte bei den Lymphompatienten auch im Endstadium eine tumorzellabtötende Wirkung durch mimotopinduzierte zytotoxische T-Zellen in vitro demonstriert werden (Rosenberg SA, J Immunol. 1999). Offensichtlich war das Immunsystem der einen Patientin soweit supprimiert, daß kostimulatorische Signale, wie z.B. die Produktion von IL-2 in vivo, nicht mehr ausreichend realisiert werden konnten und damit eine Anergie der zytotoxischen T-Lymphozyten eintrat.

2.2.7.7. Chemotherapie

Der Einsatz von Zytostatika bei der Behandlung von CTCL-Patienten ist den späten Stadien und den aggressiven Formen (z.B. SS, CD30-klein-bis mittelgroßzelliges CTCL) vorbehalten und ist derzeit aus therapeutischer Sicht absolut unbefriedigend.
Mittel der ersten Wahl ist das Methotrexat, welches in einer Dosierung von 50 bis 100mg/Woche appliziert wird. Gerade Patienten mit Tumormanifestation profitieren über viele Monate von dieser Therapie bei guter Lebensqualität. Bei Patienten mit erythrodermischer MF oder SS wird die Gabe einer kombinierten Chlorambucil-Prednisolon-Therapie favorisiert. Darunter kann auch der quälende Juckreiz bei einigen Patienten gut beherrscht werden. In letzter Instanz wird eine Polychemotherapie, in der Regel nach dem CHOP-Schema angewendet. Andere Schemata sind möglich (Muche JM, Seminars Cutan Med Surg, 2000).
Die initialen Ansprechraten nach 1 bis 3 Zyklen einer Chemotherapie liegen nach unseren Erfahrungen bei 80%. Problematisch ist, daß in den applikationsfreien Intervallen das Tumorwachstum zunimmt und schon kurze Zeit nach Beendigung der Chemotherapie (6 Zyklen) ein nicht mehr zu beherrschendes Rezidiv auftritt. Ein weiteres Problem ist der Tumorzerfall unter Chemotherapie, welcher zu ausgeprägten Lymphödemen führen kann. Häufig sterben die Patienten unter der Polychemotherapie an Infektionen und Kachexie.

2.2.7.8. Knochenmarktransplantation

Diese Therapie (autolog, heterolog) wurde bei Patienten mit CTCL durchgeführt, ist jedoch aufgrund kurzer rezidivfreier Zeiten, kurzer Überlebensraten, schwerer Nebenwirkungen und hohem technischen Aufwand derzeit nicht zur Behandlung von CTCL geeignet (Molina A, Biol Blood Marrow Transplant, 1999; Sterling JC, Clin Exp Dermatol, 1995; Koeppel MC, Acta Derm Venereol, 1994).

3. Ätiopathogenese primär kutaner Lymphome

3.1. B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Lymphome

Die physiologische Entwicklung einer B-Zelle findet in mehreren aufeinanderfolgenden Entwicklungsschritten statt, wobei sich morphologische (Veränderung der Zellgröße und des Zellkerns), phänotypische (Expression von Molekülen, z.B. CD20, CD79a) und genetische Merkmale (z.B. Rearrangement und Mutation der Immunglobulin-Gene) ändern. Diese Merkmale charakterisieren gemeinsam das physiologische Entwicklungsstadium eines B-Lymphozyten.

Da maligne B-Zellen analoge morphologische, phänotypische und genotypische Charakteristika aufweisen, können die lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zelle (Lymphome und Leukämien) entsprechend dem physiologischen Erscheinungsbild klassifiziert werden. Je nach Klassifikationssystem steht die Histologie, die Klinik oder die Genetik im Vordergrund der Betrachtung.

In Zusammenhang mit den vorgestellten Publikationen dieser Arbeit soll im folgenden näher auf die Immunglobulingene eingegangen werden. Im Ergebnis der physiologischen B-Zell-Entwicklung ist die gesunde B-Zelle ein Unikat.

Nachdem feststeht, daß die pluripotente Stammzelle aus dem Knochenmark sich zur B-Zelle differenzieren wird (cell lineage commitment), werden die Gene der Immunglobulinketten rearrangiert. Genetisch existieren für jedes Gen mehrere Vorlagen, welche als Keimbahngene bezeichnet werden (V_H: 51 Gene, D: 27 Gene und J_H: 6 Gene, V_κ: 40 Gene, J_κ: 5 Gene, V_λ: 29 Gene, J_λ:4 Gene).

In der Pre-B-Zelle werden die D-J_H-Gene rearrangiert, gefolgt von der V_H-DJ_H- und anschließenden V_L-J_L-Rekombination. Das Leichtketten-Rearrangement findet zunächst im Genlocus der κ-Kette statt und bei einem fehlerhaften Prozeß danach im λ-Locus. Zwischen den Genen V_H-D-J_H bzw. V_L-J_L befinden sich die N-Regionen, welche in jeder B-Zelle durch Anfügen und Abdauung einzelner Nukleinsäuren verschieden sein können. (Abbildung 9)

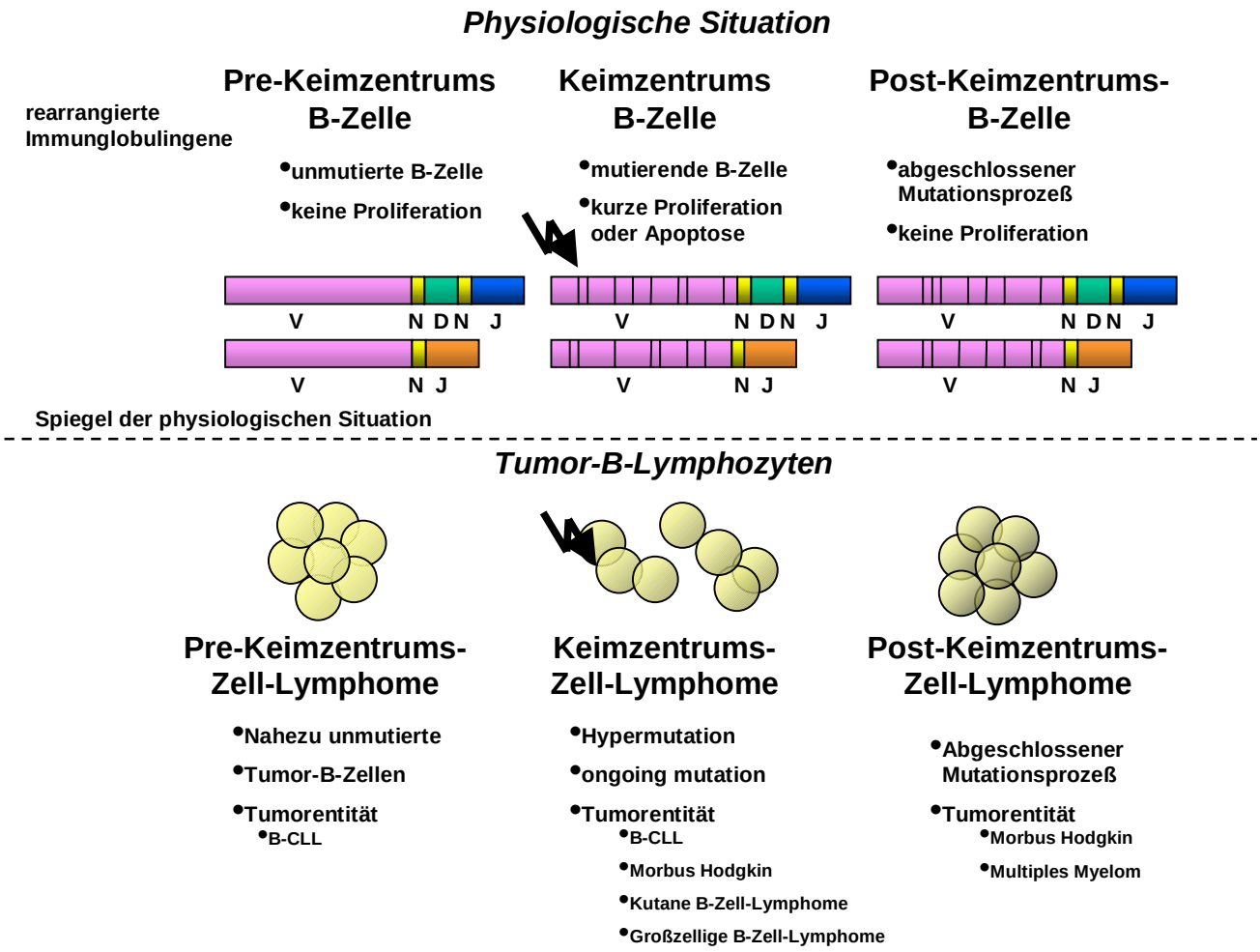
Nach Abschluß der V_HDJ_H- und V_LJ_L-Gen-Rearrangements und der Verbindung zum konstanten Teil der Cμ-Kette kann der Antikörper transkribiert und exprimiert werden. Die jetzt als unreif bezeichnete B-Zelle hat im Keimzentrum eines Lymphknotens die Möglichkeit, über ihren B-Zell-Rezeptor (Antikörper) ein Antigen zu erkennen. Dieser Kontakt sichert der B-Zelle das Überleben. Findet sie kein Antigen, unterliegt sie der Apoptose. Bei erfolgreichem Antigen-Antikörper-Kontakt wird die Bindung zwischen beiden Komponenten optimiert. Dazu kann die B-Zelle in geringem Umfang proliferieren (ca. 8-10 gleiche B-Zellen innerhalb eines Keimzentrums) und somatisch mutieren. Erreicht die B-Zelle eine hochaffine Rezeptor-Antigen-Bindung, wechselt die Immunglobulinklasse durch Austausch der Cμ-Kette mit einer Cγ-Kette. Die nun reife B-Zelle kann mehrere Jahre im Körper überleben und bei Exposition mit dem sie prägenden Antigen schnell und in größeren Mengen hochaffine IgG Antikörper produzieren (Ehlich A, Curr Opin Immunol, 1995; Rajewsky K, Ann Oncol, 1997).

Durch die Prozesse des Rearrangements und die Möglichkeit der somatischen Mutationen können nahezu unendlich viele Immunglobulinvarianten entstehen. Theoretisch kann jedes Antigen erkannt werden. Das sichert nicht nur das Überleben der einzelnen B-Zelle, sondern auch das Überleben des Gesamtorganismus in einer Umwelt mit unendlich vielen Antigenen (Tonegawa S, Nature, 1983; Dorner T, Immunol Rev, 1998). Die physiologisch erwartete Mutationsrate wird mit einem Basenpaar

pro 10^3 für physiologische B-Zellen und mit 1 Basenpaar (bp) pro 10^{10} für somatische Zellen angegeben (Berek C, Cell, 1991).

In Anlehnung an die hier geschilderte physiologische B-Zell-Entwicklung können nun auch B-Zell-Lymphome entsprechend ihren Mutationsmerkmalen klassifiziert werden. Es gibt in den Tumorzellen der B-Zell-Lymphome nahezu unmutierte V_H-Gene, z.B. bei der B-CLL, stark mutierte V_H-Gene (Hypermutationen) mit intraklonaler Diversität, z.B. bei den follikulären Keimzentrumszell-Lymphomen des Lymphknotens, in einem Teil der B-CLL –Patienten, beim Morbus Hodgkin und hypermutierte V_H-Gene ohne intraklonale Diversität, z.B. beim multiplen Myelom und im Morbus Hodgkin. Der Zuordnung zum physiologischen Keimzentrum entsprechend findet man dann die Begriffe pre-germinal-center, germinal-center und post-germinal-center B-Zell-Lymphome. (Abbildung 9)

Abbildung 9: *Darstellung der Zuordnung von physiologischen B-Zellen und deren lymphoproliferativen Äquivalente zur Keimzentrumszell-Reaktion*



3.1.1. Hypothese der Immundysregulation

Zur Erklärung des Mechanismus der Lymphomgenese wird derzeit die Hypothese der Immundysregulation bei chronischer Infektion favorisiert. Die permanente Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Erregern führt zu Stimulation und Interaktion von B- und T-Lymphozyten. In

diesem Zusammenspiel treten auch fehlerhafte Prozesse auf, welche physiologischerweise durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Bei den infektiös assoziierten MALT- Lymphomen und den CBCL, aber auch bei mit chronischer Gliadinunverträglichkeit assoziierten MALTomen des Darmes wird vermutet, daß sich einige Lymphozyten der Kontrolle des Immunsystems entziehen und so in Zusammenwirkung mit weiteren Faktoren, z.B. zunehmenden genetischen Instabilitäten, entarten können. Solange die Abhängigkeit der Stimulation von T- und B-Zellen durch die Infektion besteht, kann die Elimination der Erreger den Prozeß der Lymphomentstehung unterbrechen. Hat sich eine autonome Tumorzellpopulation etabliert, wächst sie auch unabhängig von der Stimulation der umgebenden Zellen und ist durch eine antientzündliche Therapie nicht mehr zu beeinflussen (Du MQ, Lancet Oncol. 2002; Isaacson PG, Mod Pathol, 1999; Dummer R, Semin Cutan Med Surg, 2000).

3.1.1.1. Helicobacter pylori assoziierte MALTome

Der Londoner Histopathologe P.G. Isaacson konzentrierte sich in seinen Forschungen auf Lymphome des Gastrointestinaltraktes. Er stellte fest, daß primäre Lymphome in lymphatischen Organen einige Eigenschaften wie die entsprechenden Organe besitzen, z.B. IgA-Produktion in den Tumorzellen. Entsprechend prägte er den Begriff MALT (mucosa- associated lymphoid tissue)-Lymphome. Die Existenz von MALT am Ort der potentiellen Lymphomentstehung allein reicht nicht aus, um zur nachfolgenden Entartung eines Gewebes zu führen. Voraussetzung ist ein chronisch persistierender Entzündungsstimulus (Du MQ, Lancet Oncol, 2002; Isaacson PG, Mod Pathol, 1999; Isaacson P, Cancer, 1983). Diese Entzündungsreize können infektiöser oder autoimmuner Genese sein. So kann beispielsweise bei der Helicobacter pylori assoziierten Gastritis im Magen, bei Zöliakie im Darm, beim Sjögren-Syndrom in den Speicheldrüsen, bei der Hashimoto-Thyreoiditis in der Schilddrüse und bei der follikulären Bronchiolitis in der Lunge das Auftreten von MALT beobachtet werden (Du MQ, Lancet Oncol, 2002; Isaacson PG, Mod Pathol, 1999; De Vita S, Adv Clin Path, 1997; Santana V, Clin Immunol Immunopathol, 1992; Dummer R, Semin Cutan Med Surg, 2000). Physiologischerweise werden diese lymphatischen Infiltrate in den genannten Organen nicht gefunden. Der zunehmende Erwerb von genetischen Aberrationen, z.B. t(11;18)(q21;q21) oder t(1;14)(p22;q32) oder t(1;2)(p22;p12) kann zu einer Transformation der malignen Zelle führen, welche dann unabhängig vom infektiösen Stimulus proliferieren kann (Auer IA, Ann Oncol, 1997; Wotherspoon AC, Cancer Genet Cytogenet, 1992; Ye H, Am J Pathol, 2000).

Unterlegt werden die Erkenntnisse von P.G.Isaacson, daß chronisch entzündliches Gewebe mit Lymophomentstehung assoziiert ist, durch klinische Beobachtungen. Wotherspoon et al. konnten bei 28% aller Patienten mit Helicobacter pylori assoziierter Gastritis lymphatisches Gewebe im Magen nachweisen, das die Struktur von MALT aufwies (Wotherspoon AC, Lancet, 1991). Weiterhin wurde in 92% aller untersuchten primären MALT-Lymphome des Magens eine Helicobacter pylori- Besiedlung nachgewiesen, wogegen die normale Durchseuchung der Bevölkerung 50% bis 60% für diesen Erreger beträgt (Wotherspoon AC, Lancet, 1993). Nachfolgend konnte der Nachweis einer Regression von initialen MALT-Lymphomen im Magen nach erfolgreicher Eradikationstherapie (antibiotische Behandlung von Helicobacter pylori) gezeigt werden. Hussell et al. bewies die Stimulierbarkeit von Tumorzellen durch Helicobacter pylori in vitro, allerdings nur wenn sich die T-Zellen aus dem Tumorinfiltrat in der Kultur befanden. Daraus kann geschlossen werden, daß die Tumor-B-Zellen des

Magens von spezifischen T-Lymphozyten abhängig sind (Hussell T, J Pathol, 1993). Die Immunglobuline der Tumor-B-Zellen zeigten dagegen keine Spezifität gegenüber Helicobacter pylori, reagierten jedoch mit verschiedenen Autoantigenen (Hussell T, Am J Pathol, 1993). Die Mutationsanalyse der variablen Anteile der Immunglobulingene in MALTom-Tumorzellen zeigte ein Muster, welches entweder den Keimzentrumszellen oder den Post-Keimzentrumszellen (Qin Y, Blood, 1995) entspricht.

3.1.1.2. Borrelien-assoziierte primär kutane B-Zell-Lymphome

Das Konzept des SALT (skin-associated lymphoid tissues) geht auf Streilein zurück. Er postulierte die Existenz eines immunologischen Subsystems, in welchem antigenpräsentierende Langerhanszellen, zytokinproduzierende Keratinozyten, epidermotrope T-Zellen und drainierende periphere Lymphknoten gemeinsam eine spezielle Immunantwort in der Haut ermöglichen (Streilein JW, J Invest Dermatol, 1983). So kann ein Schutz vor exogenen pathogenen Organismen am Ort des Eintritts gewährleistet werden.

Langerhanszellen nehmen eingedrungene Pathogene auf, zerlegen sie in immunogene Peptide und präsentieren sie an ihrer Oberfläche zusammen mit dem MHC-Komplex. Die epidermalen Langerhanszellen migrieren in den lokalen drainierenden Lymphknoten (parakortikale Zone) und induzieren dort eine spezifische T-Zell-Antwort. Danach verlassen die Langerhanszellen den Lymphknoten, wandern zurück in die Haut zum Ort ihrer Herkunft, wobei skin-homing-receptors (charakteristische Hautrezeptoren) eine Rolle spielen. In der Haut können sie dann eine spezifische Entzündungsantwort durch Aktivierung und Expansion von Memory-T-Zellen hervorrufen. Während ihrer Entwicklung verändern die Langerhanszellen Morphe und Funktion, beispielsweise wird MHC-Klasse II herabreguliert (Cumberbatch M, J Immunol, 1991). Dieses Modell ist besonders ausführlich bei der kontaktallergischen Dermatitis untersucht worden.

Bemerkenswert ist, daß in der entzündeten Haut T-Zellen dominieren und B-Lymphozyten nur bei wenigen Erkrankungen zu finden sind. Ähnlich den MALTomen wird vermutet, daß die Entwicklung von kutanen B-Zell-Lymphomen einen chronischen Stimulus verlangt wie es für das Vorhandensein von Helicobacter pylori bei Lymphomen des Magens beschrieben ist.

Die auslösende Ursache für kutane B-Zell-Lymphome ist ebenso unbekannt wie der Mechanismus ihrer Entstehung. Klinische Beobachtungen und paraklinische Kontrollen lassen die Vermutung einer infektiösen Genese zu. So besteht eine überdurchschnittlich häufige Assoziation eines PCBCL mit serologisch und genomisch nachgewiesener Infektion durch *Borrelia burgdorferi*. (Dummer R, Semin Cutan Med Surg, 2000; Zenahlik P, Hautarzt, 2000; Cerroni L, Am J Cutan Pathol, 1997) In einigen Fällen führt die antibiotische Therapie zur Regredienz bzw. zur vollständigen, dauerhaften Remission des bestehenden PCBCL (Zenahlik P, Hautarzt, 2000; Hofbauer GF, Dermatology, 2001) analog der kompletten Remission von initialen Lymphomen der Magenschleimhaut (MALT-Lymphome) nach Eradikationstherapie von *Helicobacter pylori* (Wotherspoon AC, Lancet, 1993). Im Gegensatz zu den bisher erhobenen Daten, konnte die Assoziation von Borrelien-Infektion und Entstehung primär kutaner B-Zell-Lymphome in den USA nicht bestätigt werden (Wood GS, J Cutan Pathol, 2001). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Spezies der Borrelien in den USA und in Europa eine Ursache für eine bestehende oder fehlende Assoziation zu primär kutanen B-Zell-Lymphomen. Sicher

ist mit dieser Beobachtung auch, daß weitere Faktoren zur Entstehung dieser Lymphome nötig sind, vorstellbar ist die genetische Disposition.

Bei CBCL und bestehender Infektion mit EBV bei einem herztransplantiertem Patienten wurde die Regredienz des Lymphoms unter Reduktion der Immunsuppression und antiviraler Therapie erreicht (Mozzanica N, J Heart Lung Transplant, 1997).

Die genannten Beispiele der antibiotischen Therapie von Erregern ebenso wie die Unterbrechung entzündlicher Prozesse und die damit verbundene Regredienz von Tumoren weisen auf einen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und Lymphomgenese hin.

3.2. Das CD30-Molekül in der Lymphomgenese

3.2.1. Die Bedeutung des CD30-Moleküls in nicht-kutanen Lymphomen

Das CD30-Antigen erlangte sein wissenschaftliches Interesse als charakteristisches Merkmal auf Reed-Sternberg- (RS) Zellen beim Morbus Hodgkin. (Durkop H, Cell, 1992) Der allgemein akzeptierte Phänotyp von RS-Zellen beim Morbus Hodgkin ist CD30+ (95%), CD15+ (75%) und CD20+ (22%) (Rudiger T, Am J Surg Pathol, 1998). Obwohl CD30 ein charakteristisches Merkmal für RS-Zellen ist, wird es auch bei anderen lymphoproliferativen Erkrankungen gefunden, v.a. bei den ALCL (de Kan R, Neth J Med, 1993) und der LyP. (Willemze R, Blood, 1997) Die lösliche Form des CD30-Antigens stellt bei Morbus Hodgkin und ALK negativen ALCL einen prognostischen Faktor dar. (Zinzani PL; J Clin Oncol, 1998; Nadali G, Blood, 1998)

3.2.2. CD30 und genetische Veränderungen

In CD30+ lymphoproliferativen Erkrankungen wie dem ALCL wurde in 65% der Fälle die Translokation t[2;5] nachgewiesen. t[2;5] führt zu einer Fusion des Nucleoplasmin-Gens (NPM) auf dem Chromosom 5q35 mit einem Tyrosin-Kinase kodierenden Gen, welches als „anaplastic lymphoma kinase“ ALK bezeichnet wird und auf dem Chromosom 2p23 liegt. (Falini B; Blood, 1999) Die Prognose ALK positiven ALCL ist wesentlich besser als von ALK-negativen ALCL. (Falini B; Blood, 1999; Pulford K, Curr Opin Hematol, 2001) In ALCL von HIV-infizierten Patienten, in primären kutanen CD30+ T-Zell-Lymphomen und beim Morbus Hodgkin wurde das Transkript des Fusionsproteins NPM/ALK nicht nachgewiesen (Wellmann A, Blood, 1995).

3.2.3. CD30 und assoziierte Infektionen

Ein weiterer interessanter Aspekt der CD30+ Lymphome ist ihre Assoziation zur EBV-Infektion. So ist der Nachweis von EBV die am häufigsten assoziierte genetische Abnormalität beim Morbus Hodgkin (Stein H, Ann Oncol, 1991; Niedobitek G, Ann Oncol, 1996; Leenman EE, Arkh Patol, 1999). Es wird vermutet, daß die EBV-Infektion vor einer Expansion der H-RS-Zellen besteht. Das LPM1, ein EBV kodiertes Protein, dürfte in den unreifen Lymphozyten einen aktivierten Phänotyp hervorrufen und eine Modulation der Zytokinexpression bewirken. Es kommt so zu einer lokalen Hemmung der EBV-spezifischen Immunität, welche in EBV-positiven Patienten gefunden wird (Niedobitek G, Ann Oncol, 1996). Die erfolgreiche Behandlung eines nach Transplantation entstandenen primär kutanen B-Zell-Lymphoms durch Einsatz eines antiretroviralen Medikamentes und Reduktion der Immunsuppression

bei EBV-Nachweis, lässt ebenfalls eine Assoziation zwischen Infektionserreger und Lymphomgenese im primär kutanen B-Zell-Lymphomen vermuten (Mozzanica N, J Heart Lung Transplant, 1997).
Auch andere Viren werden häufiger bei lymphoproliferativen CD30+ Erkrankungen gefunden wie z.B. das HTLV-I, welches in der ATL einen obligatorischen Kofaktor darstellt und damit eine pathogenetische Rolle in der Lymphomgenese spielt (Ohshima K, Int J Cancer, 1997).

3.2.4. Die Bedeutung des CD30-Moleküls in primär kutanen Lymphomen

Die Prognose von CD30+ Lymphomen der Haut einschließlich der lymphomatoiden Papulose ist günstiger als die von primär kutanen CD30- Lymphomen (Willemze R, Blood, 1997). Die häufig bei großzelligen CD30+ anaplastischen Lymphomen der Haut im Kindesalter nachgewiesene Translokation t[2;5] fehlt den CD30+ primär kutanen Lymphomen der Erwachsenen (Gordon BG, Cancer, 1993). Das deutet möglicherweise auf eine andere Genese der kutanen Lymphome hin und kann zur Unterscheidung kutaner Lymphome von systemischen Lymphomen genutzt werden (DeCoteau JF, Blood, 1996). Bei nachgewiesener Transkription des NPM-ALK in kutanen Lymphomen besteht im Gegensatz zu den ALK+ ALCL keine Korrelation mit der Prognose des Patienten (Vergier B, Am J Surg Pathol, 1998).
Pathophysiologisch ist die Rolle des CD30-Moleküls in den kutanen Lymphomen jedoch nicht endgültig geklärt.
Die wohl umfassendste Betrachtung hat die Arbeitsgruppe um Kadin et al angestellt. Dabei wurde die Beobachtung genutzt, daß großzellige anaplastische CD30+ T-Zell-Lymphome (ALCL) infolge einer lymphomatoiden Papulose (LyP) entstehen können. Die Untersuchung von Zelllinien aus LyP-Läsionen und von daraus abstammenden ALCL-Zelllinien mit dem gleichen T-Zell-Rezeptor-Gen-Rearrangement führten zu einer umfassenden Hypothese über den möglichen Einfluß von Faktoren in der Tumorgenese: In den Läsionen der lymphomatoiden Papulose tritt normalerweise die CD30-vermittelte Apoptose aufgrund der intakten Rückkopplung zwischen CD30 und CD30L ein. Bei auftretenden Defekten der CD30+ Zelle kann die Apoptose gestört sein und ein Zellwachstum einsetzen, z.B. durch Mutation im Gen des TGF-β-Rezeptors, eine gestörte FAS/FAS-Ligand – Interaktion oder einen Defekt in der CD30/CD30 Ligand-Interaktion (Levi E, J Invest Dermatol, 2000; Mori M, Blood, 1999, Knaus PI, Mol Cell Biol, 1996; Schiemann WP, Blood, 1999).
CD30+ B-Zell-Lymphome unterliegen keiner eigenen Klassifikation. Es fällt jedoch auf, daß es CBCL mit ausgeprägter CD30-Expression gibt. Dabei können die Zellen beispielsweise in der Mantelzone eines Keimzentrumszell-Lymphoms oder einzeln verstreut im Infiltrat liegen.
Eine Assoziation von EBV-Infektion und kutanen B-Zell-Lymphomen ist in 10% bis 25% der Fälle nachgewiesen worden (Mozzanica N, J Heart Lung Transplant, 1997). Das CD30-Antigen und die EBV-Infektion könnten auch bei den CBCL, ähnlich wie beim Morbus Hodgkin, eine pathogenetische Rolle in der Lymphomentstehung spielen. Unklar ist, ob es sich bei diesen CD30+ Zellen um reaktive, nicht klonale Lymphozyten handelt, welche sich in einem bestimmten Aktivierungszustand befinden, oder dem Zytokinnetzwerk entgleiste klonale Tumorzellen. Die Bedeutung und die genetischen Eigenschaften dieser Zellen in kutanen B-Zell-Lymphomen sind bislang vollständig unbekannt.

3.3. Ätiopathogenese der Mycosis fungoides

In der Ätiopathogenese der Mykosis fungoides gibt es zwei immunologisch sehr interessante Aspekte: Zum einen können Übergangsstadien von der großfleckigen Parapsoriasis en plaques in eine Mykosis fungoides beobachtet werden (Stachowitz S, Blood, 2000), andererseits kann der Verlauf der Mykosis fungoides zeitlich sehr stark, von wenigen Monaten bis zu jahrzehntelanger langsamer Progression, variieren (Willemze R, Blood, 1997). Somit kann die Existenz effektiver Abwehrmechanismen zur Reduktion der Tumorzellen postuliert werden. Die Mykosis fungoides kann somit als ein natürliches, im Zeitlupentempo ablaufendes Modell der Tumorgenese betrachtet werden.

3.3.1. Bedeutung der T-Zell-Klonalität bei Mykosis fungoides und Parapsoriasis en plaques

In der Haut und im Blut von Patienten mit Mykosis fungoides ist in bis zu 75% der Proben ein klonales Amplifikat für das T-Zell-Rezeptor (TCR)-γ -Gen-Rearrangment zu finden. Dieses PCR-Produkt kann sequenziert und damit das individuelle TCR-Gen-Rearrangement der Tumorzelle festgestellt werden. Dieser Genabschnitt ist dann wegweisend für weitere tumorbezogene Untersuchungen, z.B. bei der Analyse von peripheren Blut-Lymphozyten. Wird für diese Untersuchungen nicht nur eine einfache PCR durchgeführt, sondern eine Kapillarelektrophorese (Fluoreszenz-Fragment-Analyse = FFA), kann das Längen-Spektrum der PCR-Produkte dargestellt sowie in gewissen Grenzen eine grobe quantitative Aussage für den Klon getroffen werden. Mit Hilfe der FFA konnte nachgewiesen werden, daß die Parapsoriasis en plaques beim Übergang in eine Mykosis fungoides von einem poly- oder oligoklonalen Muster in ein Spektrum mit klonaler Dominanz übergeht (Muche JM, Blood, 1999). Möglicherweise wird der Übergang von physiologischen Lymphozyten in eine Tumorzellpopulation durch eine chronische antigene Stimulierung verursacht. Man stellt sich vor, daß bei chronisch aktivierten T-Zellen häufiger genetische Aberrationen auftreten und sich ansammeln. Ab einem gewissen Zeitpunkt existieren soviel genetische Veränderungen, daß eine Zelle mit Tumoreigenschaften entstanden ist, wobei die genaue Kombination der nötigen Aberrationen nicht bekannt ist.

3.3.2. Infektionserreger

Ebenfalls unklar ist, welche Faktoren die Tumorgenese fördern. Weder Infektionserreger noch Umwelteinflüsse konnten mit dem Auftreten der Mykosis fungoides assoziiert werden (Whittemore AS, J Natl Cancer Inst, 1989) Die Virusgenese ist häufig untersucht worden, vor allem hinsichtlich von Retroviren, jedoch nur im Einzelfall nachzuweisen und steht in keiner Beziehung zur Mykosis fungoides (Meijer CJ, Semin Cancer Biol, 1996; Kanavaros P, Pathol Res Pract, 1994; Wood GS, Am J Pathol, 1997).

3.3.3. Genetische Prädisposition und genetische Veränderungen

Eine HLA-Assoziation besteht zu HLA Aw31, Aw32, B8, Bw35 und DR5 (Dick HM, Dermatologica, 1977).

Studien haben gezeigt, daß das bekannte Onkogen p53 in frühen Läsionen der Mykosis fungoides keine Bedeutung für die Pathogenese hat, jedoch unter UV-Exposition häufiger Mutationen des p53-Gens auftreten. Kommt es zu einer Überexpression von p53, ist der Verlauf der Erkrankung

ungünstiger (Whittaker S. Ann N Y Acad Sci. 2001; McGregor JM, J Invest Dermatol. 1999; Li G, J Invest Dermatol. 1998; Beylot-Barry M, Arch Dermatol. 1995). Die Expression des bcl-2 Moleküls in primär kutanen T-Zell-Lymphomen hat keinen Einfluß auf die Prognose der Patienten (van Haselen CW, J Cutan Pathol. 1997; Kanavaros P, Pathol Res Pract. 1994).
Genetische Aberrationen, deren Bedeutung jedoch noch nicht geklärt sind, werden regelmäßig und unabhängig vom Stadium der Erkrankung auf den Genen p15 und p16 gefunden.(Garatti SA, Recent Results Cancer Res, 1995; Scarisbrick JJ, J Invest Dermatol, 2002).

3.3.4. Verlauf und Transformation der Mykosis fungoides

Für die Entstehung und Ausbreitung eines Tumors ist nicht nur die maligne Zelle zu betrachten, sondern auch das Immunsystem in seiner Tumorabwehrfunktion. Normalerweise können veränderte Zellen durch spezifische T-Zellen erkannt und nachfolgend eleminiert werden. Diese Wechselbeziehung zwischen Tumorzelle und Immunsystem scheint gerade bei der Entwicklung und dem Fortschreiten der Mykosis fungoides von Bedeutung zu sein. Seitens der Tumorzelle in der Mykosis fungoides gibt es Hinweise, daß sie sich gut vor den Zugriffen des Immunsystems schützen kann, z.B. zirkulieren die Zellen im peripheren Blut und im Lymphknoten, ohne erkannt zu werden, z.B. wandern die pleomorphen Tumorzellen in die Epidermis ein oder kapseln sich dermal in mit Bindegewebe umgebenen Arealen ab und entziehen sich damit dem Immunsystem (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000).
Für eine effiziente Tumorabwehr spricht der jahrelange klinische Verlauf der Mykosis fungoides, bei dem die kutane Manifestation dominiert. So werden bei Vorliegen eines bandförmigen lymphohistiozytären Infiltrates im Plaquestadium der Mykosis fungoides nur wenige Tumorzellen nachgewiesen. Häufen sich die genetischen Aberrationen einer Tumorzelle der MF an, kann es zu einer Transformation kommen, die zu einer Progression der Mykosis fungoides führt. Die Tumorzellen verlieren ihren ausschließlichen Epidermotropismus. Sie bilden Knoten an der Haut und können extrakutane Organe besiedeln (Vergier B, Blood, 2000; Diamandidou E, Blood, 1998).

3.3.5. Tumorspezifische Abwehrmechanismen

Die tumorspezifische Abwehr wird maßgeblich durch CD8+ zytotoxische, MHC-I restringierte und CD16+ Lymphozyten, realisiert. Die Anzahl und die Funktionalität der zytotoxischen T-Zellen ist stadienabhängig und von der Entität bestimmt. Das Vorkommen vieler zytotoxischer T-Zellen korreliert mit einer besseren Prognose des T-Zell-Lymphoms (Lorincz AL, Lancet, 1996; Asadullah K, J Invest Dermatol, 1997; Wood GS. J Invest Dermatol, 1995).
Vermittelt wird die Interaktion verschiedener Zellen des Immunsystems und der Tumorzellen durch Zytokine. Sie können die malignen Zellen in ihrem Wachstum stimulieren, ihr skin-homing (Einwanderung der Zellen in die Haut) beeinflussen und anti-Tumorzell-Antworten unterdrücken (Hansen ER, Arch Dermatol, 1996). In frühen Läsionen der Mykosis fungoides dominiert ein TH1-Zytokinmuster, wogegen in späteren Stadien ein TH2-Muster gefunden wird. Dieses Prinzip wird therapeutisch umgesetzt, indem ein Wechsel zum TH1-Muster bei der Behandlung der Patienten angestrebt wird, z.B. durch die Anwendung von Interferon α (Asadullah K, Exp Dermatol, 1998). Beim

Übergang vom Plaque- zum Tumorstadium steigt die Expression von IL10. IL15 und IL7 stellen potente Wachstumsfaktoren für Sézary- Zellen dar (Dalloul A, J Clin Invest, 1992).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß primär kutane T-Zell-Lymphome Neoplasien des SALT (skin associated lymphoid tissue) sind. Chronische Stimulierung von T-Lymphozyten durch unbekannte Faktoren und genetische Instabilität dürften die Tumorgenese initiieren und unter Einfluß eines veränderten Zytokinnetzwerkes erhalten.

4. Methoden

4.1. Mikromanipulation

4.1.1. Geschichte der Mikromanipulation

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts nutzten Mikrobiologen mechanische Hilfsmittel, um unter mikroskopischer Sicht tierische embryonale Blastomeren zu untersuchen (Peterfi, Naturwissenschaften,1923).

Den entscheidenen Fortschritt bei der Entwicklung der Technik der Mikromanipulation erbrachten die Erfordernisse der in-vitro-Fertilisation im Rahmen der Reproduktionsmedizin. Dabei wird unter mikroskopischer Sicht das Spermium in eine Eizelle verbracht. Weitere Anwendungen der Mikromanipulation bestehen heute in der Zellkern-Isolierung aus Einzelzellen und gezieltem Einbringen von DNA in Zellen (Hardy K, Reproduction, 2002). Küppers et al. etablierten die Mikromanipulation zur Isolierung von Einzelzellen aus dem histologischen Schnitt zur Erforschung des Morbus Hodgkin (Küppers R, Mol Med Today, 1995). In Anlehnung an diese Technik isolierten wir Einzelzellen von primär kutanen Lymphomen, welche dann einer PCR-Analyse zugeführt wurden (Gellrich S, Biochemica, Boehringer Mannheim, 11/97).

Moderne Verfahren ermöglichen die Mikromanipulation lasergesteuert. Dabei können einzelne Zellen und größere Zellverbände unter Monitorkontrolle disseziert werden. Vorteilhaft ist dabei die Möglichkeit des Einsatzes von fluoreszenzoptischen Verfahren und die schnelle Gewebegewinnung, welches dann zur Herstellung von cDNA aus mRNA verwendet werden kann. Nachteilig ist jedoch die bisher niedrige Effizienz bezüglich der intakten DNA bei Einzelzellen. Möglicherweise läßt sich dieser Nachteil durch Optimierung der Energiebündelung am Laser optimieren (Schutze K, Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998).

4.1.2. Immunhistochemische Markierung

In Vorbereitung der Einzelzell-Isolierung ist es notwendig die Zellen immunhistochemisch durch einen Maus-Anti-Human-Antikörper zu markieren, z.B. gegen CD20, Kappa, Lambda oder CD30-Moleküle. Die genauen Angaben zum jeweiligen markierenden Primärantikörper werden in den betreffenden Abschnitten 3. und 5. genannt bzw. sind in den Publikationen detailiert nachzulesen. (Abbildung 10)

Zunächst wird von einer kryokonservierten Hautprobe ein 8µm bis 10µm dicker Schnitt hergestellt. Dieser wird ca. 10 Minuten mit Aceton fixiert und anschließend 1 Stunde mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Spülung der Schnitte in TBS-Pufferlösung erfolgt die Reaktion mit einem sekundären Antikörper einer anderen Spezies, z.B. Ziege-Anti-Maus-Antikörper über 30 Minuten. Der sekundäre Antikörper ist entweder mit Biotin oder alkalischer Phosphatase markiert. Die Verstärkungsreaktion

wird durch Reaktion des Biotin-Moleküls mit der alkalischen Phosphatase über einen Streptavidin-Komplex realisiert. Abschließend erfolgt die Farbreaktion (Rotfärbung) über 15 Minuten mit Chromogen (Neufuchsin/Naphtol-AS-Biphosphat). Bei Anwendung einer Peroxidase-Färbung ändert sich die Markierung des Sekundärantikörpers mit Natriumperjodat. Die eigentliche Färbung wird durch die Zugabe eines Enzyms erreicht, welches eine chemische Reaktion und damit die Färbung auslöst. Eine Gegenfärbung der Zellkerne wird mit Hämatoxylin-Lösung durchgeführt. Die bei diesen Arbeiten verwendeten KITs bzw. Antikörper wurden überwiegend von den Firmen DAKO und DIANOVA bezogen.
Die Präparate wurden bis zur Mikromanipulation in TRIS-HCl (0,5 M, pH 7,6)-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

4.1.3. Hydraulische Mikromanipulation

Die Mikromanipulation erfordert ein Umkehrmikroskop (z.B. Nikon, Diaphot 300). Nach Einstellung und photographischer Dokumentation des gewünschten Ausschnittes erfolgt unter 600facher Vergrößerung die Isolierung der immunhistochemisch markierten Einzelzellen mittels einer aus glühendem Glas gezogenen (Micropipette Puller) und geschliffenen Kapillare (Pipette Grinder), welche durch einen hydraulischen Mikromanipulator (NARISHIGE MO-188) manuell gesteuert wird. Die so isolierte einzelne Zelle wird durch Erzeugung eines Unterdrucks in der Kapillare in die Glasröhre angesaugt. Anschließend erfolgt die Überführung der Einzelzelle in ein PCR-Röhrchen mit 20µl 1x PCR-Puffer ohne MgCl und 1ng/µl 5SrRNA durch Erzeugung eines Überdrucks. Die Zugabe von 5SrRNA soll das Adhärieren von DNA an der Gefäßwand verhindern. Es konnten jedoch auch erfolgreiche Experimente ohne Zugabe von 5SrRNA durchgeführt werden. Die Zellen werden bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. (Abbildung 10)

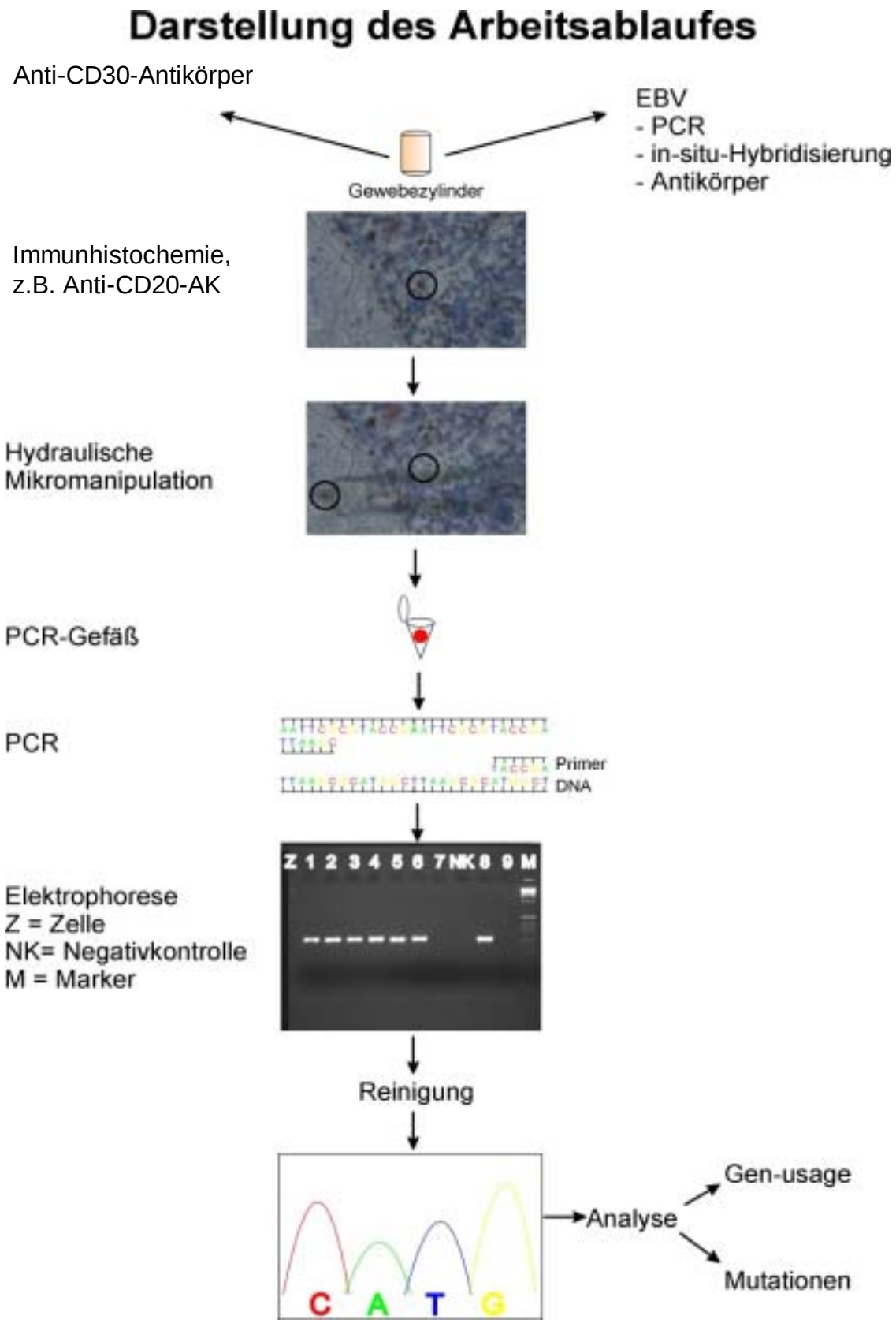


Abbildung 10

4.2. Molekularbiologische Analyse

4.2.1. Einzelzell-PCR

Die in dieser Arbeit vorgestellten PCR-Analysen an Einzelzellen wurden generell an genomischer DNA vorgenommen. Prinzipiell ist die gleichzeitige Amplifikation verschiedener Gene aus der genomischen DNA einer einzelnen Zelle möglich. Bei der Untersuchung primär kutaner Lymphome wurde die PCR für folgende Gene etabliert: schwere Kette des Immunglobulins (V_HDJ_H), leichte Ketten des Immunglobulins Kappa und Lambda (V_LJ_L), T-Zell-Rezeptoren- γ und -ß (VJ), EBV-Genom.

Der eigentlichen PCR-Analyse ist ein Proteinverdau vorangestellt. Dabei wird die in Puffer befindliche Einzelzelle mit 0,5µl Proteinase K (Konzentration 0,5mg/ml) über 55 Minuten inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe der PCR-Reagenzien bis zu einem Volumen von 50µl. Die Primer und Annealingtemperaturen sind der Tabelle V zu entnehmen.

Prinzipiell werden die PCR-Amplifikationen der Immunglobulin- und TCR-Gene in 2 Runden als seminested-PCR (halbgeschachtelte PCR) vorgenommen. Dabei werden interne Primer bei den B-Zell-Rezeptor-Genen in der 2. Runde am 3‘ –Ende und bei den T-Zell-Rezeptor-Genen am 5‘-Ende eingesetzt. Vom Produkt aus der ersten Runde der PCR wird 1µl in das Reaktionsgemisch der 2. Runde gegeben, wobei jetzt jede V-Familie einzeln amplifiziert wird. Die detailierten Reaktionsbedingungen sind in zahlreichen Publikationen veröffentlicht worden (siehe Abschnitt 10).

4.2.2. Darstellung der PCR-Produkte, Sequenzierung, Datenanalyse

Anschließend erfolgt die Visualisierung der Produkte mittels Gelelektrophorese auf einem 2% Agarose-Gel. (Abbildung 10)

Da es sich bei der Einzelzelle gewöhnlich um ein oder zwei Produkte handelt, kann das PCR-Produkt der 2. Runde direkt sequenziert werden. Dazu wird der Sequenzierer ABI 373 (Applied Biosystems) und der Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing KIT (Perkin Elmer) verwendet. (Abbildung 10) Mit Software-Programmen können die Sequenzen untereinander aber auch innerhalb eines Gens verglichen werden (Sequence Navigator, Applied Biosystem). Die so erstellte Textdatei (ATCG) wird dann mit internationalen Datenbanken zur Identifizierung der passenden Keimbahngene bzw. der vorhandenen Mutationen verglichen (Advanced WU-BLAST2 Search, EMBL und IGMT(http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/; http://imgt.cines.fr:8104/textes/vquest/).

Parallel wird jede Sequenz mit einer laborinternen Bank verglichen zum Ausschluß von Kontaminationen und Feststellung von Klonalitäten. Jede neu gefundene Sequenz wird in die Labordatenbank eingegeben.

Die hier genutzten Primer für die Analyse der B-Zell-Rezeptor-Gene lassen sich für genomische DNA und für cDNA nutzen, welche aus Biopsien gewonnen wurden ohne Separierung von Einzelzellen. Die TCR-γ-Gene lassen sich nur auf genomischer Ebene, nicht aber aus cDNA amplifizieren, da der T-Zell-Rezeptor-γ nicht mehr auf der reifen T-Zelle exprimiert wird. TCR-β kann auch auf cDNA-Ebene mit den vorgestellten Primern amplifiziert werden.

***Tabelle V**: Bezeichnung und Gen-Sequenz der Primer und ihrer Annealing-Temperaturen für verschiedene Gene*

Bezeichnung	Gen-Familie	Annealing 1. Runde	Annealing 2. Runde	Primer	Konzentration in der PCR-Reaktion
VH1	IgH VH 1, 7	59 ° C	61 ° C	CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C	0,2 µ M
VH2	IgH VH 2	59 ° C	61 ° C	GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAC A	0,2 µ M
VH3	IgH VH 3	59 ° C	61 °C	GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG	0,2 µ M
VH4	IgH VH 4	59 ° C	61 ° C	GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C	0,2 µ M
VH5	IgH VH 5	59 ° C	61 ° C	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A	0,2 µ M
VH6	IgH VH 6	59 ° C	61 ° C	ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	0,2 µ M
JH1ext.	IgH JH 1,2,4,5 ext.	59 ° C		ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	0,2 µ M
JH3ext.	IgH JH 3 ext.	59 ° C		TAC CTG AAG AGA CGG TGA CCA TTG T	0,2 µ M
JH6ext.	IgH JH 6 ext.	59 ° C		ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT	0,2 µ M
JH1int.	IgH JH 1,4,5 int.		61 ° C /65 ° C	GAC GGT GAC CAG GGT KCC CTG GCC	0,2 µ M
JH2int.	IgH JH 2 int.		61 ° C 65 ° C	GAC AGT GAC CAGGGT GCC ACG GCC	0,2 µ M
JH3int.	IgH JH 3 int.		61 ° C /65 ° C	GAC GGT GAC CAT TGT CCC TTG GCC	0,2 µ M
JH6int.	IgH JH 6 int.		61 ° C /65 ° C	GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTK GCC	0,2 µ M
Vκ1	Igκ Vκ 1	59 ° C	61 ° C	GAC ATC C(AG)G(AT) TG ACC CAG TCT C(AT)TC	1,0 µ M
Vκ2	Igκ Vκ 2	59 °C	61 ° C	CAG WCT CCA CTC TCC CTG YCC GTC A	1,0 µ M
Vκ3	Igκ Vκ 3	59 ° C	61 °C	TTG TGW TGA CRC AGT CTC CAG SCA CC	1,0 µ M
Vκ4	Igκ Vκ 4	59 ° C	61 ° C	AGA CTC CCT GGC TGT GTC TCT GGG C	1,0 µ M
Vκ5	Igκ Vκ 5	59 ° C	61 ° C	CAG TCT CCA GCA TTC ATG TCA GCG A	1,0 µ M
Vκ6	Igκ Vκ 6	59 ° C	61 ° C	TTT CAG TCT GTG ACT CCA AAG GAG AA	1,0 µ M
Jκ1ext.	Igκ Jκ 1,2,4 ext.	59 ° C		ACT CAC GTT TGA TYT CCA SCT TGG TCC	1,0 µ M
Jκ3ext.	Igκ Jκ 3 ext.	59 ° C		GTA CTT ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CC	1,0 µ M
Jκ5ext.	Igκ Jκ 5 ext.	59 ° C		GCT TAC GTT TAA TCT CCA GTC GTG TCC	1,0 µ M
Jκ1int.	Igκ Jκ 1,2 int.		61 ° C	TTG ATY TCC ASC TTG GTC CCY TGG C	1,0 µ M
Jκ3int.	Igκ Jκ 3 int.		61 ° C	TTG ATA TCC ACT TTG GTC CCA GGG C	1,0 µ M
Jκ4int.	Igκ Jκ 4 int.		61 ° C	TTG ATC TCC ACC TTG GTC CCT CGG C	1,0 µ M
Jκ5int.	Igκ Jκ 5 int.		61 ° C	TTA ATC TCC AGT CGT GTC CCT TGG C	1,0 µ M
Vλ1	Igλ Vλ 1	59 ° C	63 ° C	GGT CCT GGG CCC AGT CTG TG	1,0 µ M
Vλ2	Igλ Vλ 2	59 ° C	63 ° C	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT	1,0 µ M
Vλ3a	Igλ Vλ 3a	59 ° C	63 ° C	CTC AGC CAC CCT CAG TGT CCG T	1,0 µ M
Vλ3b	Igλ Vλ 3b	59 ° C	63 ° C	CTC AGC CAC CCT CGG TGT CAG T	1,0 µ M
Vλ4	Igλ Vλ 4	59 ° C	63 ° C	TTT CTT CTG AGC TGA CTC AGG AC	1,0 µ M
Vλ6	Igλ Vλ 6	59 ° C	63 ° C	GAG TCT CCG GGG AAG ACG GTA	1,0 µ M
Vλ7	Igλ Vλ 7	59 ° C	63 ° C	GTG GTG ACT CAG GAG CCC TCA C	1,0 µ M
Vλ8	Igλ Vλ 8	59 ° C	63 ° C	ACT GTG GTG ACC CAG GAG CCA	1,0 µ M
Vλ9	Igλ Vλ 9	59 ° C	63 ° C	CCT GTG CTG ACT CAG CCA CCT	1,0 µ M
Jλ1ext.	Igλ Jλ 1 ext.	59 ° C		GCC ACT TAC CTA GGA CGG TGA C	1,0 µ M
Jλ2ext.	Igλ Jλ 2,3 ext.	59 ° C		GAA GAG ACT CAC CTA GGA CGG TC	1,0 µ M
Jλ6ext.	Igλ Jλ 6,7ext.	59 ° C		GGA GAC TYA CCG AGG ACG GTC	1,0 µ M
Jλ1int.	Igλ Jλ 1 int.		63 ° C	GGA CGG TGA CCT TGG TCC CAG T	1,0 µ M
Jλ2int.	Igλ Jλ 2,3,7 int.		63 ° C	GAC GGT CAG CTT GGT SCC TCC	1,0 µ M
Jλ6int.	Igλ Jλ 6 int.		63 ° C	GAC GGT CAC CTT GGT GCC ACT	1,0 µ M
Vgcons	TCR-γ V 1-8 ext.	58 ° C		CTA CAT CCA CTG GTA CCT	1,0 µ M
Vg9ext.	TCR-γ V 9 ext.	58 ° C		ATT GGT ATC GAG AGA GAC	1,0 µ M
Vg10/11ext.	TCR-γ V 10,11 ext.	58 ° C		CAC TGG TAC KKG CAG AAA C	1,0 µ M
Jg1/2	TCR-γ J 1,2 ext.	58 ° C		CAA CAA GTG TTG TTC CAC	1,0 µ M
Vgseq	TCR-γ V 1-8 int.		58 ° C	AGR CCC CAC AGC ATC TTC	1,0 µ M
Vg9	TCR-γ V 9 int		58 ° C	GGA AAG GAA TCT GGC ATT CCG	1,0 µ M
Vg10	TCR-γ V 10 int.		58 ° C	AAT CCG CAG CTC GAC GCA GCA	1,0 µ M
Vg11	TCR-γ V 11 int.		58 ^C	GCT CAA GAT TGC TCA GGT GGG	1,0 µ M
Jcons	TCR-γ J 1,2 int.		58 ° C	CAA CAA GTG TTG TTC CAC	1,0 µ M
Vβ3	TCR-β V 3	58 ° C	58 ° C	GTA ACC CAG AGC TCG AGA TAT CTA	1,0 µ M
Vβ5.1	TCR-β V 5.1	58 ° C	58 ° C	AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC	1,0 µ M
Vβ6	TCR-β V 6	58 ° C	58 ° C	TCT CAG GTG TGA TCC AAA TTC GGG	1,0 µ M
Vβ22	TCR-β V 22	58 ° C	58 ° C	AAG TGA TCT TGC GCT GTG TCC CCA	1,0 µ M
JβI-1	TCR-β J 1 ext.	58 ° C		ACI GWG AGY CIR GTY CC	1,0 µ M
JβII-1	TCR-β J 2 ext.	58 ° C		ACI GTS AGC CKI GTG CC	1,0 µ M
JßI-1	TCR-β J 1 int.		58 ° C	WGA GYC IRG TYC CII IIC CAA A	1,0 µ M
Jß II-1	TCR-β J 2 int.		58 ° C	TSA GCC KIG TGC CIG SIC CGA A	1,0 µ M
EBV I		59 ° C	61 ° C	GAG GTC AGG TTA CTT ACC CCT GAA G	0,2 µ M
EBV II		59 ° C	61 ° C	TCT CAG GGT CCC CTC GGA CAG CTC C	0,2 µ M

4.2.3. Keimbahn- und Mutationsanalysen

Nach Vorliegen der Nukleinsäure-Sequenz der identifizierten Gene wurden die Daten wissenschaftlich analysiert. Zu Beginn einer jeden Analyse erfolgt der Vergleich des gewonnenen Gens mit der analogen Keimbahn- Konfiguration der rearrangierten Gene über die genannten Datenbanken (http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/; http://imgt.cines.fr:8104/textes/vquest/). Der Auswahl der Gene (usage) wird bei der Pathogenese einiger Erkrankungen eine Bedeutung beigemessen. So werden beispielsweise die Gene V_H1-69.1 und V_H1-02 häufig von der Tumorzelle bei B-CLL-Patienten verwendet (Sakai A, Blood, 2000). Möglicherweise haben Zellen, welche dieses V_H- Gen rearrangiert haben, eine erhöhte Anfälligkeit für den Erwerb genetischer Aberrationen. Ähnliches wird über Patienten mit Autoimmunerkrankungen berichtet. So wurde ein bevorzugtes V_H-Gen-usage des Keimbahngenes V_H3-11 bei SLE-Patienten nachgewiesen. Vermutlich führt die starke B-Zell-Aktivierung bei einem SLE-Schub zu einem veränderten V_H- Gen-usage, wodurch Autoimmunität nicht mehr verhindert werden kann (Dorner T, J Immunol, 1999).

Im zweiten Schritt werden die Mutationen auf dem individuellen Gen untersucht. Dabei wird wiederum die Nukleotidfolge der Keimbahn mit der Sequenz des individuellen Gens verglichen. Die Beurteilung der Mutationen erfolgt dann nach verschiedenen Gesichtspunkten:

1. Die N-Regionen, welche die Identität eines Gens maßgeblich kennzeichnen, werden identifiziert. (Abbildung 9) Bei mehrmaligem Auftreten des gleichen Gens innerhalb eines Patienten kann von einer klonalen Proliferation der untersuchten Zellen ausgegangen werden. Werden identische Gene in verschiedenen Patienten gefunden, kann bei sorgfältiger Führung einer internen Labor-Gen-Datenbank eine Kontaminationen schnell erkannt werden.
2. Die Anzahl der Mutationen in verschiedenen Gen-Abschnitten (CDR, FR) wird ermittelt.
3. Die Anzahl der Mutationen gegenüber der potentiell physiologischen B-Zelle wird im Analogieschluß zur individuellen Zelle errechnet.
4. Fortlaufende Mutationen (ongoing mutations) und intraklonale Diversität werden untersucht.
5. Die Qualität der Mutationen (silent, replacement, potentiell produktiv oder nicht produktiv) wird ermittelt.

Physiologische B-Zellen haben die Möglichkeit, im Keimzentrum des Lymphknotens zu mutieren. Zunächst ist die Mutationsmaschinerie in den noch proliferierenden Zentroblasten, welche sich in der dunklen Zone des Lymphknotens befinden, aktiviert. So können auch in physiologischen expandierten Zentroblasten geringe Unterschiede bei der Lokalisation von Mutationen gefunden werden, welche als intraklonale Diversität bezeichnet werden. (Kuppers R, EMBO J, 1993). Wird dieser Prozeß der fortlaufenden Mutationen im Verlauf betrachtet, spricht man von „ongoing mutations“. Aus den Zentroblasten entwickeln sich die zur Teilung unfähigen Zentrozyten, welche dann in der sogannten hellen Zone des Lymphknotens erscheinen und antigenabhängig selektioniert werden. (Hentges F. Clin Exp Immunol, 1994) Die physiologische Mutationsrate liegt bei 10^{-3} pro Basenpaar und Zellzyklus. In Lymphomen kann die Mutationsrate bis zu 1 Mutation pro Zellzyklus gesteigert sein (Kuppers R, EMBO J, 1993) Die Gedächtniszelle weist dann eine Mutationsrate von ca. 4% auf (Berek C, Cell, 1991).

Analog zu den physiologischen Entwicklungsstadien lassen sich entsprechend der Erläuterungen im Abschnitt 3.1. und der Abbildung 9 die lymphoproliferativen B-Zell-Erkrankungen aus genetischer Sicht in Pre-Keimzentrumszell, Keimzentrumszell- und Post-Keimzentrumszell-Lymphome einteilen.
Die antigene Selektion ist ein diffiziler Prozeß. Die einfache Tatsache, daß Mutationen auf dem Gen des Immunglobulins stattfinden, garantiert die Affinitätsreifung des später entstehenden Immunglobulins nicht. Offensichtlich spielt auch die Lokalisation der Mutation eine Rolle. So werden die V-Gene in verschiedene Abschnitte entsprechend ihrer Funktion gegenüber dem Antigen eingeteilt: 1. in die CDR's (complementary determining regions), welche im Protein die Kontaktstellen zum Antigen darstellen und 2. in FR's (Framework), welche die Stützfunktion des Proteins erfüllen. Obwohl von einer Akkumulation der Mutationen in den CDR's ausgegangen wird, wissen wir heute, daß durchaus auch in den FR's Mutationen auftreten können.
Der Erfolg der Affinitätsreifung hängt zusätzlich von den Auswirkungen der Mutationen auf die Kodierung der Aminosäure ab. Demnach unterscheidet man „**S**ilent mutations" (Mutationen ohne Änderung der Aminosäure) und „**R**eplacement mutations" (Mutationen, in deren Folge sich die Aminosäure ändert). Nur Austauschmutationen können einen Effekt bei der Affinitätsreifung des B-Lymphozyten erreichen. Bei rein zufälligen Mutationen mit gleichmäßiger Verteilung über die CDR's und die FR's unter Beachtung von 61 Aminosäurekodierungen ergeben sich 526 Mutationsmöglichkeiten, 74,5% würden zu Austausch- und 25,5% zu stummen Mutationen führen (Jukes TH, Nature, 1979). Die **R/S-Ratio** beträgt dann 2,9. Werte der R/S-Ratio größer 2,9 werden in dieser Berechnung als positive Selektion der stattgefundenen R-Mutationen beurteilt, Werte kleiner 2,9 als Mechanismus zur Erhaltung der Protein-Struktur. Da die R/S-Ratio (**intrinsische R/S-Ratio**) vom Triplet abhängig ist , z.B. in der CDR1 R/S-Ratio$_{ATG}$= 9/0 und R/S-Ratio$_{CGA}$= 4/4, führen Mutationen hier überdurchschnittlich häufig zu Aminosäureaustauschen. Die erwartete R/S-Ratio kann dann höher sein. (Chang B, Immunol Today, 1994).
Die Methodik zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten von R-Mutationen wurde durch weitere Modelle ergänzt. Gebräuchlich sind folgende Berechnungen (Shlomchik MJ, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987):

$q = Rf \times CDR_{rel}$

$n : [R_{erw}]_{CDR} = q \times n$ („mehr R-Mutationen als erwartet" spricht für antigene Selektion)

$p = [n!/ k!(n-k)!]q^k(1-q)^{n-k}$ („geringe Wahrscheinlichkeit" spricht für eine selektionierte Mutationsverteilung)

q: Wahrscheinlichkeit mit der eine im VH-Gen auftretende Mutation als R-Mutation in den CDR's erwartet werden kann
Rf: Frequenz der Austauschmutationen = 0,745;
CDR_{rel} : relative CDR-Größe zum gesamten V_H;
n : Mutationen insgesamt in einem V_H-Gen
$[R_{erw}]_{CDR}$: erwartete Anzahl der R-Mutationen
q x n : tatsächlich beobachtete Anzahl der R-Mutationen
k: Anzahl der beobachteten R-Mutationen in den CDR's
p: Wahrscheinlichkeit von Mutationen

Um eine genauere Aussage über antigenbedingte Selektion zu erhalten, muß die R/S-Ratio mit der intrinsischen R/S-Ratio verglichen werden.
Als potentiell produktiv wird ein Gen bezeichnet, welches aufgrund seiner Nukleotid-Sequenz in eine Aminosäure transkribiert werden könnte. Demzufolge dürfen Stop-Codons nicht enthalten sein.

4.2.4. Klonierung

Besonders häufig konnten bei den T-Zell-Analysen biallelische Gen-Rearrangements nachgewiesen werden. Um die Gen- Sequenzen beider Allele eindeutig zu identifizieren, bedienten wir uns der Technik der TA-Klonierung mittels eines kommerziellen KIT (TA-Cloning®, Firma Invitrogen®). Im Anschluß wurden die Plasmide einer linearen PCR unterzogen, wobei jeweils ein spezifischer Primer des gesuchten PCR-Produktes oder ein plasmidspezifischer Primer (M13R oder T7) verwendet worden ist. Die Sequenzierungsauswertung der Gensequenzen erfolgte wie im Abschnitt 4.1.5. erläutert.

4.2.5. Fluoreszenz-Fragment-Analyse (FFA)

Die Primer Vg1 und Vg2 (V10/V11) oder Jg1/2 wurden am 5'-Ende mit dye 5-carboxy-fluorescein (FAM) fluoreszenzmarkiert. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte der FFA wurden auf dem Gerät ABI 310 PRISM (capillary) oder auf dem Gerät ABI 373A (PAGE) (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) analysiert. Für die FFA auf dem ABI 310 PRISM wurden 12µl deionisiertes Formamid und 0,5µl Genescan 500 TMROX interner Standard (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) zu 1µl PCR-Produkt zugegeben und bei 90°C 2 Minuten lang mit anschließender Eiskühlung denaturiert. Jeder Lauf wurde bei 60°C und 15kV mit einer 5Sekunden-Injektion und 36 Minuten Separationszeit in einer 47cm langen POP Kapillare durchgeführt (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).
Für die Analyse auf dem ABI 373 wurden 5µl deionisiertes Formamid, 0,5µl EDTA, 0,5µl Gene Scan 2500TMROX interner Standard (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und 0,5µl Dextran-Blau zu 2µl markiertem PCR-Produkt dazugegeben, wie beschrieben denaturiert, auf ein 4,75% Polyacrylamid-Gel (LC 6 premixed gel, FMC Bioproducts, Rockland, USA) aufgetragen und mit der Software „GeneScan" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) analysiert.

4.3. Etablierung der PCR für die schweren Ketten der Immunglobulingene am Beispiel des Sjögren-Syndroms (Gellrich S, Arthritis Rheum, 1999)

Das Sjögren-Syndrom ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung mit lymphozytären Infiltraten in allen exokrinen Drüsen, vor allem des Gesichtes. Klinisch stehen deshalb trockene Augen und Schleimhäute von Nase und Mundhöhle im Vordergrund. Das Sjögren-Syndrom kann ohne Begleiterkrankung oder infolge einer Autoimmunerkrankung auftreten. (Vitali C, Arthritis Rheum, 1993). Es ist bekannt, daß das Sjögren-Syndrom häufiger mit lymphoproliferativen Neoplasien assoziiert ist. (McCurley TL, Hum Pathol, 1990). Wie im Abschnitt 3.1. beschrieben, kann eine chronische antigene Stimulierung, beim Sjögren-Syndrom sind Autoantigene vorstellbar, zu einer

Immundysregulation führen, in deren Folge sich ein B-Zell-Lymphom entwickeln kann. (Tzioufas AG, Clin Exp Rheumatol, 1990).

Ziel dieser Untersuchungen war es, eine repräsentative Anzahl von V_H-D-J_H Gen-Transkripten zu untersuchen hinsichtlich ihres V_H-Gen-usage (Auswahl eines zu rearrangierenden V_H-Gens aus den möglichen Keimbahngenen) und ihrer somatischen Mutationen sowie die Frage zu beantworten, ob es zu einem Zeitpunkt, an dem keine klinisch und histologisch nachweisbare Lymphommanifestation vorlag, klonale V_H-Transkripte in verschiedenen Biopsien (Speicheldrüse und Lymphknoten) gab.

Im Rahmen der Etablierung der PCR für die B-Zell-Rezeptor-Gene und der Analyse von Lymphomen untersuchten wir cDNA aus Speicheldrüsen- und Lymphknotenbiopsien von 2 Patienten mit Sjögren-Syndrom. Beide Patienten hatten im Serum positive Titer für die Autoantikörper Ro/SSA, La/SSB und den Rheumafaktor. Klinisch konnte ein pathologischer Schirmer-Test demonstriert werden. In der Ultraschall-Untersuchung konnten vergrößerte Lymphknoten festgestellt werden, die histologisch jedoch keinen Anhalt für eine lymphoproliferative Erkrankung ergaben. Von einem Patient (IL) wurden Lippenbiopsie- und Lymphknotenmaterial untersucht, von einem zweiten Patienten (UW) eine Lippenbiopsie.

Aus dem Biopsiematerial wurde mRNA und anschließend cDNA mit Hilfe kommerzieller KITs (OligotexDirektmRNAKit, Quiagen, Chatswoth,CA; Superscript Preamoplification System, Gibco-BRL, Eggstein, Deutschland) präpariert. Die PCR für die IgH-Genfamilien wurde wie im Abschnitt 4.1.4. beschrieben durchgeführt. Für die klonspezifische PCR wurden spezielle Primer zur Bindung an der CDR3-Region entwickelt (Patient IL: 5' GCCCCAGTAGTCAAGGCCCGTAGAT 3'; Patient UW: 5' CGTCCATGTAGTAGAACCCCAGATCCC 3') Klonierung und Sequenzierung erfolgten wie in den Abschnitten 4.1.5. und 4.1.6. beschrieben.

Im Ergebnis wurden 94 V_H-D-J_H Transkripte kloniert und sequenziert. Die B-Zell-Infiltrate zeigten ein polyklonales Spektrum. In 92 V_H-Transkripten wurden somatische Mutationen gefunden. Aus der Lippenbiopsie des Patienten IL konnten 13 V_H-Gene amplifiziert werden. Alle V_H-Gene stammten von verschiedenen Keimbahngenen ab. Aus dem Lymphknoten wurden 44 V_H-Gene amplifiziert. Aus der Lippenbiopsie des Patienten UW konnten 13 Amplifikate für das V_H-Gen-Rearrangment gewonnen werden.

Von 94 zeigten 81 Transkripte Sequenzen somatische Mutationen. 13 Gene waren zu über 99% nahezu keimbahnidentisch. Nach der Analyse der R- und S- Mutationen kann festgestellt werden:

Es wurden mehr R-Mutationen in den CDR's als in den FR's gefunden. Die R/S-Ratio war vergleichbar mit dem theoretisch erwarteten Wert für die entsprechenden V_H-Keimbahngene (intrinsische R/S-Ratio). Die R/S-Ratio in den FR's war signifikant niedriger als in der erwarteten Kalkulation. R-Mutationen erschienen häufiger am Übergang von CDR1 zu FR1. Im Repertoire der V_H-Gene konnte kein bevorzugtes V_H-Gen-usage für ein Gen oder eine V_H-Gen-Familie nachgewiesen werden. In allen 3 Proben wurden unproduktive Gene gefunden. Bei dem Patienten IL wurden 3 identische PCR-Produkte aus 2 PCR-Ansätzen aus der Lippenbiopsie detektiert. Dieses Gen wurde außerdem im Lymphknoten des Patienten nachgewiesen. Auch beim Patienten UW konnten 2 identische PCR-Produkte aus 2 PCR-Ansätzen amplifiziert werden. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden keine Hinweise auf das Vorhandensein der Klone im Blut des jeweiligen Patienten gefunden.

Die somatischen Mutationen in den klonal auftretenden Genen beider Patienten wurden ausgewertet. Bei Patient IL wurden 23, 24, 25 und 27 Mutationen im individuellen klonalen VH –Gen nachgewiesen. Bei Patient UW waren 25 Mutationen zu finden. Damit bestand eine Keimbahnhomologie zu 89,2% bei Patient IL und zu 89,9% in Patient UW.

Die Daten zeigen, daß die Mehrzahl der Sequenzen polyklonal sind und somit das histologische Bild eines entzündlichen Infiltrates im Lymphknoten bestätigt wird. Sowohl das V_H-Gen-usage als auch die Mutationsmuster reflektieren ein Bild wie es auch im peripheren Blut, in der atopischen Dermatitis und im Nabelschnurblut nachgewiesen worden ist (Mortari F, J Immunol, 1993; Brezinschek HP, J Immunol, 1995; Tilgner J, Clin Exp Immunol, 1997).
Die V_H-Gen-Transkripte zeigten eine Anhäufung von somatischen Mutationen. Die R-Mutationen sind in der FR gewöhnlich weniger mutiert als in der Kalkulation erwartet, um die Struktur des Proteins zu gewährleisten. Bei nichtproduktiven Genen, welche keinem Selektionsdruck unterliegen, sollte die gefundene R/S-Ratio mit der kalkulierten erwarteten R/S-Ratio korrelieren (Kuppers R, Eur J Immunol, 1997; Braeuninger A, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997). In unseren produktiv rearrangierten Genen war die R/S-Ratio in den FR's mit 1,67 erniedrigt was für eine antigenabhängige Selektion der B-Lymphozyten durch Expression funktionell intakter Immunglobuline spricht.
Die klonalen Sequenzen, welche bei beiden Patienten durch unabhängige PCR-Experimente nachgewiesen wurden, sind nicht zwingenderweise auf eine beginnende lymphoproliferative Erkrankung zurückzuführen. Im physiologischen Keimzentrum eines Lymphknotens wurden ebenfalls gering expandierte, klonale B-Zellen nachgewiesen. Diese Zellen befinden sich offensichtlich gerade im Prozeß der Affinitätsreifung (Kuppers R, EMBO J, 1993). Bei ähnlichen Untersuchungen von B-Zell-Immunglobulingenen aus reaktiven Infiltraten primär kutaner T-Zell-Lymphome konnten jedoch keine klonalen Sequenzen gefunden werden (Golembowski S, J Cutan Pathol, 1999). Dagegen zeigten Bahler et al an Verlaufsbiopsien von Sjögren-Patienten das Vorliegen individueller klonaler Sequenzen, wobei besonders häufig die V_H-Gene V_H1-69 und V_H3-7 mit diesen Sequenzen assoziiert waren (Bahler DW, Blood, 1998). Die klonalen B-Zellen der beiden untersuchten Patienten in dieser Arbeit verwendeten die beschriebenen V_H-Gene nicht. Im Gegensatz zu den Daten von Bahler et al wurde in unseren klonalen Transkripten intraklonale Diversität nachgewiesen, welche für ongoing mutations sprechen.
Das Phänomen der intraklonalen Diversität wurde bereits in nodalen follikulären Lymphomen, MALT-Lymphomen und in primär kutanen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen (Du M, Leukemia, 1996; Bahler DW, Proc Natl Acad Sci U S A, 1992; Gellrich S, J Invest Dermatol, 2001). Ob diese ongoing mutations ausschließlich unter antigenem Einfluß möglich sind, sollte kritisch beurteilt werden. Auch andere Gene, sogenannte Proto-Onkogene in diffusen großzelligen Lymphomen der Lymphknoten sind von dem Prozeß der funktionell aktiven Hypermutation betroffen und akkumulieren somatische Mutationen (Pasqualucci L, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; Pasqualucci L, Nature, 2001).
Ob es sich bei den klonalen B-Lymphozyten um Vorläufer lymphoproliferativer Erkankungen handelt oder ob diese klonal expandierten B-Zellen zur Lymphomentstehung beitragen können, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Auf jeden Fall sollten die beiden Patienten IL und UW sehr engmaschig kontrolliert werden hinsichtlich der Manifestation von lymphoproliferativen Erkankungen.

5. Molekulargenetische Einzelzell-Analyse der variablen Anteile der schweren und der leichten Kette von Immunglobulingenen in kutanen B-Lymphozyten

5.1. Primär kutane B-Zell-Lymphome sind Keimzentrumszell-Lymphome (Gellrich et al., J Invest Dermatol 2001, Gellrich et al, J Invest Dermatol, 1997)

5.1.1. Hintergründe und Fragestellungen

Primär kutane B-Zell-Lymphome sind durch das Fehlen einer extrakutanen Manifestation über lange Zeit gekennzeichnet. (Burg G, Bull Cancer, 1977; Kerl H, Hautarzt, 1979). Obwohl die primär kutanen B-Zell-Lymphome histologisch große Ähnlichkeiten mit den nodalen follikulären Lymphomen aufweisen, unterscheiden sie sich jedoch im Verlauf, welcher bei den primär kutanen B-Zell-Lymphomen indolent bzw. intermediär aggressiv ist (Willemze R, Blood, 1997).

Innerhalb der primär kutanen B-Zell-Lymphome gibt es jedoch prognostisch heterogene Gruppen: 1. Primär kutane B-Zell-Lymphome am Stamm und Kopf, welche zu ca. 50% histologisch den Keimzentrumszell-Lymphomen und zu 50% den Marginalzonen-Lymphomen / Immunozytomen zuzuordnen sind und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 97% haben. 2. GCBCLL an der unteren Extremität mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 57%. (Vermeer MH, Arch Dermatol, 1996; Geelen FA, J Clin Oncol, 1998; Bekkenk MW, J Clin Oncol, 1999).

Entsprechend der physiologischen B-Zell-Entwicklung unterliegt der B-Zell-Rezeptor Veränderungen. So finden sich in naiven B-Zellen nahezu unmutierte, keimbahnidentische Immunoglobulin-Gene (Hummel M, Blood, 1994). Im Keimzentrum können die B-Zellen mit Hilfe der antigenpräsentierenden Zellen und mit Hilfe der T-Zellen proliferieren. Dabei führt die Erkennung von Antigen durch den B-Zell-Rezeptor zu einer Wachstumsstimulation der B-Zelle. B-Lymphozyten mit einer hohen Affinität zum Antigen werden selektiert (Lindhout E, Immunol Today, 1997). Eine optimale Anpassung ist durch das Auftreten von somatischen Mutationen gewährleistet, wobei die R-Mutationen zum Aminosäureaustausch führen. (Berek C, Cell, 1991; Jacob J, Nature, 1991). Der Mutationsstatus des Immunglobulins einer B-Zelle bzw. ihrer klonalen Vertreter gibt demzufolge Auskunft über ihre Entwicklungsstufe. In Anlehnung an dieses Prinzip können nun auch B-Zell-Lymphomzellen beurteilt werden. (Abbildung 9)

Haben alle Tumor-B-Zellen keimbahnidentische V_H- und V_L- Gene, entsprechen sie Prä-Keimzentrumszell-B-Zell-Lymphomen; zeigen sie mutierte V_H-, V_L-Gene und intraklonal verschiedene Mutationen, entsprechen sie Keimzentrumszell-Lymphomen; sind die Tumor-B-Zellen mutiert, jedoch ohne das Vorliegen von intraklonalen Diversitäten, handelt es sich um Post-Keimzentrumszell-Lymphome (Abschnitte 3.1. und 4.2.3.) (Abbildung 9).

Für die primär kutanen B-Zell-Lymphome war nicht bekannt gewesen, in welche Kategorie der molekulargenetischen Klassifikation entsprechend den B-Zell-Rezeptor-Genen diese Entitäten einzuorden sind. Es ergaben sich folgende Fragen:

- Welcher Entwicklungsstufe physiologischer B-Lymphozyten lassen sich die Tumor-B-Zellen aus primär kutanen B-Zell-Lymphomen zuordnen?

- Besteht ein Unterschied im Mutationsmuster zwischen histologischen Keimzentrumszell-Lymphomen mit Lokalisation am Stamm und Kopf gegenüber den PCBCL an der unteren Extremität?

5.1.2. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Es wurden 8 Patienten mit primär kutanen B-Zell-Lymphom untersucht. Bei 4 Patienten waren die Hautveränderungen an Kopf und Stamm lokalisiert und entsprachen histologisch einem Keimzentrumszell-Lymphom (FCCL) (Gruppe I). 4 Patienten zeigten histologisch ein großzelliges B-Zell-Lymphom (GBCLL), welches sich in allen Fällen am Bein manifestierte (Gruppe II). Immunphänotypisch wurde in allen Präparaten das CD20 Molekül, *bcl-2*- nur bei den Patienten mit GBCLL exprimiert. Die leichte Kette des Immunglobulins (kappa oder lambda) war in 7/8 Fällen immunhistochemisch nachweisbar. Alle Patienten der Gruppe 1 wiesen zwar rezidivierende Hautveränderungen auf, waren jedoch 5 Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben. In der Gruppe II verstarben 2/4 Patienten innerhalb von 1,5 Jahren.

Zur Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden die histologischen Schnitte mit einem anti-CD20-Antikörper markiert. Lediglich in Patient GG wurde ein anti-kappa-Antikörper zur Markierung verwendet. Der Methodik von Abschnitt 4 folgend, wurden insgesamt 532 Einzelzellen detektiert und anschießend die DNA in der PCR mit Primern für V_H und V_κ bzw. V_λ amplifiziert.

Bei den Patienten AZL und WS konnte kein Amplifikat für die schwere Kette des Immunglobulins amplifiziert werden. Für die leichte Kette dieser beiden Patienten erhielten wir ein PCR-Produkt.

Es ist davon auszugehen, daß die Primer aufgrund von Mutationen nicht an die schweren Ketten binden konnten. Dieses Phänomen konnte auch in anderen Experimenten nachgewiesen werden (Golembowski S, Immunobiology, 2000; Child FJ, Br J Dermatol, 2001). Daß nur eine Kette, entweder die schwere Kette oder die leichte Kette, erfolgreich rearrangiert wurde ist eher unwahrscheinlich, jedoch in diesen Experimenten nicht vollständig auszuschließen. Die Effizienz der Experimente war unterschiedlich: In 25-50% der isolierten B-Zellen wurde die schwere Kette und in 9 - 44% die leichte Kette des Immunglobulingens nachgewiesen. In keinem Fall wurde ein biallelisches Rearrangement gefunden.

Zusätzlich wurden bei 3 Patienten (UK, LB, IL) die Keimbahngene der in der Tumorzelle verwendeten V_H-Gene mittels PCR detektiert, um einen allelen Polymorphismus auszuschließen (Gellrich et al., J Invest Dermatol, 2001).

Um eine Aussage zur Transkription der Immunglobulingene in der Tumorzelle treffen zu können, erfolgte die RNA-Isolation aus kryokonserviertem Gewebe der Patienten UK und LB. Für die PCR wurden die V_H -spezifischen und kettenspezifische Primer für den Cμ-, Cγ- oder Cδ-Isotyp verwendet (Gellrich et al., J Invest Dermatol, 2001).

Nach Reinigung aller gewonnenen PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierung mit den 5' -spezifischen Primern. Ergaben die Elektropherogramme der Sequenzierung keine eindeutigen Ergebnisse, wurde die Sequenzierung mit dem 3'-Primer wiederholt und durch anschließendes Alignment (Vergleich) beurteilt (ABI Sequence navigator, Applied Biosystem, Weiterstadt).

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, das Repertoire der verwendeten Immunglobulingene und deren Mutationsmuster zu erfassen.

Analyse des IgH-Gen-Rearrangements

In den Tumorzellen wurden V_H-Gene aus 5 verschiedenen V_H-Familien, nicht jedoch aus den V_H-Familien 2 und 7 nachgewiesen. 2x konnte ein Gen der VH3-Familie gefunden werden. 4/6 Rearrangements enthielten ein J_H4-Gen, 1/6 J_H5b, 1/6 J_H3a. In 5 Fällen konnte ein D-Gen identifiziert werden. Bei Patient IL konnte kein Immunglobulingen D_H zugeordnet werden. Die N-Regionen zwischen den Genen V_HD und DJ_H waren an beiden Verbindungsstellen zu finden. (Abbildung 11) (Tabelle V)

Analyse des IgL-Gen- Rearrangements

Bei 5 Patienten enthielten die B-Lymphomzellen ein $V_\kappa J_\kappa$-Rearrangement, wobei in 4/5 Fällen das Gen IGVK3-20*1 verwendet wurde (Lefranc, Immunol Today, 1997; Barbie, Immungenet, 1998). Bei 2 Patienten wurde ein $V_\lambda J_\lambda$-Rearrangement des Leichtkettengens in der Tumorzelle nachgewiesen (Williams SC, J Mol Biol, 1996). In 5/8 Patienten konnte die Gene der schweren und der leichten Kette gleichzeitig amplifiziert werden (Abbildung 12) (Tabelle VI).

Mutationsanalyse

Alle detektierten Gene der Tumorzellen enthielten somatische Punktmutationen verglichen mit den äquivalenten Keimbahngenen. Von 3 Patienten wurden die individuellen Keimbahngene der genutzten V_H-Gene über Klonierung dargestellt und mit den somatischen Mutationen in der Tumorzelle verglichen (Abbildungen 11,12).

Die Mutationsrate betrug 9.2 und 16,3% für die schwere Kette und 5.4 und 15,5% für die leichte Kette. Die Mutationsrate wird kalkuliert als die Ratio von Nukleinsäureaustauschen pro rearrangierten V-Gen. Es wurde kein Unterschied zwischen den Entitäten GBCLL Gruppe I) und FCCL (Gruppe II) gefunden. R-Mutationen, als deren Folge ein Aminosäureaustausch stattfindet, waren über die gesamte Länge der V_H- bzw. V_L-Gene verteilt, wobei eine leichte Dominanz in den CDR's gegenüber den FR's nachzuweisen war (Abbildungen 11,12).

Ein Aminosäureaustausch (S-N) zeigte sich bei mehreren Patienten in der CDR1 (UKV_H5, ILV_H3, VMV_H3 Position 31), der CDR2 und im FR3 der schweren Kette bzw. in der CDR1, der CDR2 und im FR3 der leichten Ketten (Abbildungen 11,12).

Die kalkulierte Ratio der beobachteten R/S Mutationen verglichen mit dem erwarteten Wert der nicht selektierten zufällig mutierten V-Keimbahngene wurden nach Chang und Casali, 1994 anhand der dominierenden Gene der schweren und der leichten Ketten der Tumor-B-Zellen berechnet (Abschnitt 4.2.4.). Die kalkulierte Ratio war in 2/3 Genen der schweren Kette und in 3/3 Genen der leichten Kette für die CDR's etwas mehr erhöht als erwartet. Die FR's waren in 5/6 Fällen weniger von R–Mutationen betroffen als statistisch erwartet. Die FR's der leichten Ketten zeigten eine sehr niedrige R/S-Ratio bei den Patienten mit FCCL von Kopf und Stamm (Gruppe I) und bei 2/3 Fällen eine erhöhte R/S-Ratio bei den GBCLL (Gruppe II). Zusammengefasst spricht die R/S-Ratio für einen antigengetriebenen Prozeß in den Tumor-B-Zellen aller Patienten mit geringeren R/S- Mutationen in den FR und erhöhten R/S-Mutationen in den CDR's. Die Verteilung der Mutationen ist in beiden histologischen und klinischen Entitäten vergleichbar.

Bei 2 Patienten (UK, LB) konnte aus der mRNA/cDNA ein V_HDJ_HC-Transkript gewonnen werden: Bei beiden Patienten wurde ein klonspezifisches Cμ-Transkript für das Gen der schweren Kette nachgewiesen. Ferner wurde eine schwaches Produkt für das Cδ-Transkript bei Patient LB amplifiziert, welches allerdings aus technischen Gründen nicht sequenziert worden ist.
Bei 6/8 Patienten fanden wir innerhalb der Tumor-B-Zellen (Subklone) V-Gene der schweren oder der leichten Kette, die dem Tumorklon entsprachen, jedoch einzelne zusätzliche oder fehlende Punktmutationen gegenüber dem dominierenden Klon aufwiesen. Dieses Phänomen war bei beiden Patientengruppen vorhanden. Dabei konnte es sich um S-Mutationen, aber auch um R-Mutationen handeln, welche zum Aminosäureaustausch führten, z.B. Patient VM: VMV_H3a R-Q ohne Aminosäureaustausch und VMV_H3b von R-Q zu R-H Aminosäureaustausch an Position 50 (CDR 2) (Abbildungen 11, 12).

5.1.3. Diskussion

Die Mutationsanalyse von Immunoglobulingenen aus Tumormaterial kann schwierig sein, wenn das Gesamtmaterial einer Biopsie verwendet wird. Dabei können die Tumorzellen unterrepräsentiert sein und geringe Unterschiede in den Mutationsmustern nicht erfaßt werden. Um eine genaue Analyse dieser Gene durchführen zu können, wurden 4 Patienten mit einem Keimzentrumszell- Lymphom am Kopf und Stamm und 4 Patienten mit einem großzelligen B-Zell-Lymphom am Bein untersucht. Die Mikromanipulation und Einzelzell-PCR (Küppers R, Handbook of Experimental Immunology, 1997; Gellrich S, J Invest Dermatol,1997) stellen dabei die Methoden der Wahl dar, da individuelle Gene einer einzelnen Zelle untersucht werden können.
Die bei 6/8 Patienten detektierten Tumor-V_H-Gene zeigten keine besonders bevorzugte Nutzung einer bestimmten V_H-Gen-Familie durch die Tumorzelle, ähnlich den Ergebnissen in nodalen Lymphomen (Bahler DW, Blood, 1991; Rosenquist R, Eur J Haematol, 1999). Bemerkenswert ist jedoch das Vorkommen von 2 Genen, welche bei der B-CLL eine besondere Rolle spielen: V_H1-69-1 und V_H3-7 Möglicherweise sind diese Gene für das Auftreten in Tumorzellen prädisponiert (Bahler DW, Blood, 1998). Die leichten Ketten der Immunglobuline rearrangierten in 4/7 Fällen die Nutzung der $V_\kappa3$-20*1-Familie. Aufgrund der geringen Fallzahlen kann hier keine Statistik durchgeführt werden. Obwohl die Verwendung von $V_\kappa3$-Genen in physiologischen B-Zellen häufig vorkommt: 14% in IgM+ B-Zellen, (Foster SJ, J Clin Invest, 1997; Cox JP, Eur J Immunol, 1994; Feeney AJ, J Immunol, 1997), ist jedoch die überpräsentierte Nutzung dieses Gens in den B-Zell-Tumoren bemerkenswert. (Lefranc MP, Nucleic Acids Res, 1999; Lefranc MP Immunol Today, 1997; Barbie V, Exp Clin Immunogenet,1998). Ob sich dieses Phänomen des häufigen Auftretens bestimmter Gene in den Tumorzellen eine pathogenetische Relevanz hat oder ob es sich um ein zufälliges Auftreten handelt ist derzeit ungeklärt. Möglicherweise sind die Gene für Mutationsprozesse besonders empfindlich.

```
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
```

Abbildung 11: *Aminosäuren der schweren Ketten der tumorindividuellen Gene, obere Reihe Patienteninitialen, zweite Reihe Keimbahngene, folgende Reihen einzelzellindividuelle Sequenzen des dominierenden Klons und der Subklone, obere Box Patientengruppe I (FCCL), untere Box Patientengruppe II (GBCLL), R-Mutationen grau unterlegt, D-Gene unterstrichen*

```
                FR1          CDR1         FR2          CDR2         FR3                          CDR3

PATIENT UK          15     20     25     30         35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGKV3-20*1      LSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA   WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP
UKVK3A          ------------- ---K--------   ----R---------- S--K--- -------------------------------- ---DN--    PMCTF
UKVK3B          -----R------- ---K--------   ----R---------- S--K--- -------------------------------- ---DH--    PMCTF

PATIENT WS          15     20     25     30         35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGKV3-20*1      LSLSPGERATLSC RASQSVSSSYLA   WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP
WSVK3A          ------------- ------T--L--   --------------- -S-R--- -------------------------------- --F----      YTF
WSVK3B          ------------- ----R-T--L--   --------------- -S-R--- -------------------------------- --F----      YTF
WSVK3C          ------------- -----TR-L-V   --------------- -S-R--- -------------------------------- --F----      YTF
WSVK3D          ------------- ------T--F--   --------------- -S-R--- -------------------------------- --F----      YTF

PATIENT LB          15     20     25  3031A B    35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGLV3-21*2      APGQTARITC GGNNIGSKSVH    WYQQKPGQAPVLVVY DDSDRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSDH
LBVL3A,B,C,D    --------S- --DK--N----    --HL-S--G--V--- ---E--A --CD-I------------------------- -----IV--  PIFG
LBVL3E          --------S- E-DK--N----    --HL-S--G--V--- ---E--A --CD-I------------------------- -----IV--  PIFG

PATIENT GG              20     25     30         35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGKV3-20*1              TLSC RASQSVSSSYLA   WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP
GGVK3                   ---- K---IINER--G   ----RS--S------ -T-A--- -------------I---N-------------- ---A---   HTFGQ

PATIENT VM              20     25     30         35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGKV3-20*1          RATLSC RASQSVSSSYLA   WYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSP
VMVK3               ------ -----I-NK---   --------------- ------- -------------------NN-K------F-- -------   QTFGQ

PATIENT DG              20     25     3031A B C  35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGLV2-8*1           SVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLMIY EVSKRPS GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYC SSYAGSNN
DGVL2A              ------ --SN---------- -F------S-Q-I-F D-T---- ------------------I----S-------- --F--V-- LYVFGS
DGVL2B              ------ --SNN--------- -F------S-Q-I-F D-T---- ------------------I----S-------- --F--V-- LYVFGS

PATIENT AZL         15     20     25     30         35     40     45     50     55     60     65     70     75     80     85     90
IGKV1-5*3       LSASVGDRVTITC RASQSISSWLA    WYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYNSYS
AZLVK1A,C       -------T-IL-- -S--H-N----    --------------- ---T-H- --------------------G---------F- H--ST--    RFTF
AZLVK1B         -------T-IL-- -S--H-N----    --------------- ---T-H- --------------------G-------I-F- H--ST--    RFTF
```

Abbildung 12: *Aminosäuren der leichten Ketten der tumorindividuellen Gene, obere Reihe Patienteninitialen, zweite Reihe Keimbahngene, folgende Reihen einzelzellindividuelle Sequenzen des dominierenden Klons und der Subklone, obere Box Patientengruppe I (FCCL), untere Box Patientengruppe II (GBCLL), R-Mutationen grau unterlegt*

Tabelle VI: *Anzahl und Keimbahnzuordnung der Tumor-Klone und -Subklone der untersuchten Patienten*

Patient	Anzahl der analysierten Zellen	Klonales IgH-Gen-Rearrangment (V_HDJ_H)	Anzahl der klonalen IgH-Gen-Rearrangments	Klonale IgL-Gen-Rearrangments (V_LJ_L)	Anzahl der klonalen IgL-Gen-Rearrangements[1]	Anzahl der Zellen mit IgH- und IgL-Genen
UK	129	IGHV5-51UK—D6-13—J_H5b	19 (UKVH5A) 13 (UKVH5B)	IGKV3-20*1—JK2	6 (UKVK3A) 5 (UKVK3B)	4
WS	100	-	-	IGKV3-20*1—JK2	3 (WSVK3A) 5 (WSVK3B) 12 (WSVK3C) 4 (WSVK3D)	-
LB	126	IGHV4-59*3—D7-27—J_H4	44 (LBVH4A) 1 (LBVH4B) 1 (LBVH4C)	IGLV3-21*2—J_L2/J_L3	28 (LBVL3A) 1 (LBVL3B) 1 (LBVL3C) 3 (LBVL3D) 1 (LBVL3E)	24
GG	18	IGHV1-69*1—D3-22—J_H4	8	IGKV3-20*1—JK2	8	6
IL	45	IGHV3-7*1—D?—J_H3a	14	-	-	-
VM	42	IGHV3-74*1—D1-26—J_H4	21 (VMVH3A) 1 (VMVH3B)	IGKV3-20*1—JK2	13	11
DG	36	IGHV6-1*1—D6-25—J_H4	9 (DGVH6A) 1 (DGVH6B) 1 (DGVH6C) 1 (DGVH6D) 1 (DGVH6E) 1 (DGVH6F)	IGLV2-8*1—J_L1	8 (DGVL2A) 1 (DGVL2B)	6
AZL	36	-	-	IGKV1-5*3—JK3	13 (AZLVK1A) 1 (AZLVK1B) 1 (AZLVK1C)	-

In den Tumor-B-Zellen der hier untersuchten Patienten wurde bei keinem der 8 Patienten ein biallelisches Rearrangement der Immunglobulingene gefunden. Alle detektierten Gene enthielten kein Stop-Codon und sind somit potentiell produktive Gene. In anderen Experimenten konnten biallelische Rearrangements für physiologische und maligne B- und T-Zellen nachgewiesen werden, so daß ein technischer Fehler ausgeschlossen werden kann (Golembowski S, J Cutan Pathol, 1999.; Brezinschek HP, J Immunol, 1995; Dorner T, J Immunol, 1997; Brauninger, Blood, 1999). Möglicherweise deutet das Auftreten von monoallelischem Rearrangement auf eine relativ geringe molekulargenetische Instabilität in den primär kutanen B-Zell-Lymphomen gegenüber aggressiveren nodalen B-Zell-Lymphomen hin, welche die Prozesse von Hypermutation, Genrearrangement und Klassenwechsel der Immunglobuline umfasst (Kuppers R, N Engl J Med, 1999). Der prognostische Unterschied zwischen den beiden pCBCL-Entitäten kann mit dieser Hypothese der genetischen Instabilität derzeit nicht erklärt werden. Zusätzliche Faktoren, wie z.B. die *bcl-2*-Expression dürften eine Rolle spielen (Geelen FA, J Clin Oncol, 1998).

Die Mutationsanalysen der Tumorgene zeigten in allen Fällen für beide Immunglobulinkettengene hohe Mutationsraten (5,4-16,3%), welche über den Werten der physiologischen Keimzentrumszellen liegen (Pascual V, J Immunol, 1994; Tomlinson IM, J Mol Biol, 1996, Williams SC, J Mol Biol, 1996). Die Verteilung von Replacement versus silent-Mutationen (R/S-Ratio) über die Regionen der CDR und FR entsprach dem erwarteten Wert (Chang B, Immunol Today, 1994). Diese Daten zeigen, daß die Tumorzelle einer antigenen Selektion unterlag, jedoch der Prozeß der Mutationen offensichtlich über das normale Maß hinaus stattgefunden hat. Besonders in den FR können R-Mutationen gefunden werden. Die FR sind für die Stabilisierung der Antikörper verantwortlich. Der genaue Einfluß einer einzelnen Mutation auf die Affinität eines Antikörpers zum Antigen ist in den hier gewonnenen Ergebnissen nicht genau festzustellen, da schon eine einzelne Mutation zur wesentlichen Strukturänderung im Antikörper führen kann. Ebenfalls ist unklar, ob die somatischen Mutationen vor oder während der Tumorentwicklung stattgefunden haben. Der Nachweis eines genübergreifenden Mutationsmechanismus (Pasqualucci L, Nature, 2001) spricht für beide Möglichkeiten. Einige Mutationen sind schon im Rahmen der physiologischen Keimzentrumszell-Reaktion erworben worden, andere jedoch während der Tumorgenese. Das erklärt auch das Auftreten von intraklonalen Diversitäten innerhalb eines Tumorklones. Dieses Phänomen der intraklonalen Diversität wurde bei allen 8 Patienten nachgewiesen. Im Vergleich zu einer Arbeit von Aarts, welcher überwiegend Immunozytome der PCBCL untersuchte, ist die Frequenz der intraklonalen Diversitäten in Keimzentrumszell-Lymphomen und großzelligen B-Zell-Lymphomen am Bein geringer (Aarts WM, Blood, 1998). Es wird vermutet, daß die geringere intraklonale Diversität mit der Aggressivität eines B-Zell-Lymphoms korreliert und somit einen prognostischen Anhaltspunkt bietet (Matolcsy A, Eur J Immunol, 1999). Bei 2 Lymphompatienten zeigte das Immunglobulin der Tumorzelle einen IgM-Isotyp, wovon auch Aarts in seiner Arbeit berichtet (Aarts WM, Blood, 1998).

Potentiell produktive Gene und intraklonale Diversität sprechen für einen Einfluß der Tumor-Immunglobuline auf die Lymphomgenese ähnlich den MALTomen im Magen bei chronischer Infektion mit *Helicobacter pylori*. Eine antibiotische Behandlung, welche zur Unterbrechung des chronischen Stimulus führt, kann in beiden Fällen die Rückbildung initialer Lymphome bewirken. (Kutting B, J Am

Acad Dermatol, 1997; Roggero E, Hum Pathol, 2000; Wotherspoon AC, Lancet, 1991; Hussell T, Lancet, 1993).

Zusammenfassend kann anhand der Daten festgestellt werden, daß die Immunglobulingene der FCCL und der GBCLL ein Mutationsmuster entsprechend dem Keimzentrum aufweisen und damit den sogenannten Keimzentrumszell-Lymphomen angehören wie z.B. auch ein Teil der Hodgkin-Lymphome und der B-CLL (Kuppers R, Adv Cancer Res, 2002; Sakai A, Blood, 2000). Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Entitäten der PCBCL hinsichtlich der Mutationsmuster und des Immunglobulingen-usage der Tumorzellen gefunden werden.

Nach Darstellung von Alizadeh sind unterschiedlich stark exprimierte Gene für den Verlauf von B-Zell-Entitäten in den nodalen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen verantwortlich (Alizadeh AA, Nature, 2000).

5.2. Intraklonale Diversität bei primär kutanen B-Zell-Lymphomen

5.2.1. Hintergründe und Fragestellungen

Somatische Hypermutationen und intraklonale Diversität sind ein Merkmal von Keimzentrumszell-Lymphomen, was in verschiedenen vorangegangenen Abschnitten (3.1.1., 4.1.3., 5.1) dargelegt wurde (Abbildung 9). Beim Nachweis von intraklonalen Diversitäten bzw. „ongoing mutation“ wird ein Lymphom als Keimzentrumszell-Lymphom eingeordnet. Fehlen diese bei bestehenden Hypermutationen, entspricht das Lymphom einem Post-Keimzentrumszell-Lymphom. Um diese Unterscheidung genau zu verifizieren, ergab sich folgende Fragestellung:

- Kann die Unterscheidung von Keimzentrumszell-Lymphom und Post-Keimzentrumszell-Lymphom anhand einer einzelnen Biopsie erfolgen?
- Ist intraklonale Diversität in verschiedenen Biopsien innerhalb einer Läsion nachzuweisen?
- Läßt sich intraklonale Diversität zeitlich nachvollziehen (ongoing mutation)?
- Kann intraklonale Diversität in räumlich entfernten Läsionen nachgewiesen werden?
- Ist in den Tumorzellen das Fehlen von intraklonaler Diversität auf nur einer Kette aussagekräftig?

5.2.2. Nachweis von intraklonaler Diversität in zeitlich unterschiedlichen, räumlich entfernten Biopsien (Golembowski, Immunobiol, 2000)

5.2.2.1. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Von einem 52 jährigen Patienten UK mit einem histologisch gesichertem FCCL wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Erkrankung und von verschiedener Lokalisation Hautbiopsien entnommen. Die Biopsie A erfolgte von einer am Kopf manifesten Läsion 1994, die Biopsien B und C von Rezidiven in loco 12/1995 und 07/1996 sowie von einem späteren Rezidiv mit retrobulbärer Manifestation (D) (Tabelle VI). Mittels Staginguntersuchung konnte eine extrakutane Beteiligung stets ausgeschlossen werden.

Histologisch zeigten alle Proben den Befund eines diffusen FCCL mit Zentrozyten und Zentroblasten im Infiltrat. Der Phänotyp war CD20+, CD5-, CD10-, bcl-2-. Aus den Proben A, C, D wurden CD20+Einzelzellen isoliert. Genomische DNA wurde aus den Proben B und D aus dem gesamten Biopsiematerial (bulk-DNA) hergestellt. Aus Probe D wurde zusätzlich cDNA präpariert.

Entsprechend der beschriebenen Methodik wurden CD20+ B-Zellen mittels hydraulischer Mikromanipulation isoliert und anschließend mittels Einzelzell-PCR für die schwere und die leichten Ketten (κ, λ) des Immunglobulingens analysiert. Alle Produkte wurden sequenziert. Für die Probe D wurde ein sequenzspezifischer V_H-Primer zur Identifizierung der Tumorgene eingesetzt (Golembowski, Immunobiol, 2000).

Tabelle VI: *Ergebnisse der Einzelzell-Analyse*

Biopsie	Lokalisation	Anzahl isolierter Einzelzellen	Ergebnisse	Sequenzbezeichnung
A 11/94	Kopf	66	• 19 identische V_HDJ_H • 6 identische Vκ	A_{HCR} B_{HCR}, $B_{\kappa CR}$
B 12/95	Kopf	Gesamt-DNA	• Die gleiche Sequenz wurde in unabhängigen PCR-Analysen nachgewiesen	B_{HSC}
C 07/96	Kopf	63	• 13 identische V_HDJ_H • 5 identische $V_\kappa J_\kappa$	C_{HSC} C_{HCR}, $C_{\kappa CR}$
D 03/97	retrobulbär	97 Gesamt-DNA cDNA	• ausschließlich polyklonale Zellen • Nachweis des Klons in verschiedenen PCR-Analysen	D_{HCR} D_{HcDNA}

In den Proben A und C konnten die individuellen Immunglobulingen- Sequenzen der schweren Kette auf Einzelzell-Ebene nachgewiesen werden. In Probe D zeigte die Einzelzell-PCR ausschließlich nichtklonale Gene des Immunglobulin-Rezeptors in allen isolierten Zellen. In den Proben B und D wurden diese individuellen Gene auf Ebene der genomischen Gesamt – DNA (bulk) ebenfalls nachgewiesen.

Innerhalb einer Biopsie A oder C konnten sowohl in den Genen der leichten Kette als auch in den Genen der schweren Kette des Immunglobulins ausschließlich identische Gene beobachtet werden. Beim Vergleich der Biopsien untereinander zeigten sich jedoch Unterschiede in den somatischen Mutationen. (Abbildungen 13, 14)

Die chronologische Reihenfolge der Biopsien entsprach nicht der Reihenfolge der auftretenden Mutationen. Bei Analyse der somatischen Mutationen kann ein „Mutations-Bäumchen“ konstruiert werden. (Abbildung 15)

Es konnten Mutationen in der späten Probe B gefunden werden, welche in der frühen Probe A noch nicht existierten. So kann postuliert werden, daß für diese beiden Subklone A und B eine gemeinsame Vorläuferzelle X existiert hat. Die Subklone B und C sind ebenfalls intraklonal divers und könnten demzufolge auch aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle X* hervorgegangen sein, welche jedoch später als die Vorläuferzelle X aufgetreten sein muß. Die Probe D repräsentiert eine Subpopulation von A. In diesem Fall entspricht das zusätzliche Auftreten von somatischen Mutationen der zeitlichen Abfolge der Biopsien. (Abbildung 15)

Die Daten für die Mutationsanalyse in FR und CDR sind in Tabelle VII dargestellt:

Tabelle VII: *Mutationsanalyse der Tumorgene des Patienten UK*

Gen-Region	Relative Größe	Gefundene Mutationen			Kalkulierte	P[b)]
		R	S	R/S	R/S Ratio[a)]	
CDR	66/234=9,282	5	1	5	3.6	0,13
FR	168/234=0,718	6	3	2	3.4	

a) Chang and Casali, Ann.N.Y.Sci, 1995, b) Shlomchik, Proc.Natl.Acad.Sci., 1987

***Abbildung 13**: Nukleinsäure-Sequenz der V_HDJ_H-Gen-Rearrangements eines Patienten mit primär kutanem Keimzentrumszell-Lymphom in chronologischer Reihenfolge; die keimbahnidentische Sequenz ist in der ersten Reihe dargestellt; SC= Einzelzelldaten; CR= Gesamt-DNA; H= schwere Kette;*
Die folgenden Reihen bezeichnen die Subklone des Patienten; R-Mutationen werden als große Buchstaben und S-Mutationen als kleine Buchstaben dargestellt.

```
                Intron><Exon      -1  +1                                  10                                                  20
V5-51UK         CCC ACA GGA GTC TGT GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT
V5-51           --- --- --- --- --- T-- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
AHsc (11/94)                                                                                                                -- --- --- --- --- ---
BHcR (12/95)    --- --- --- --- --- -G- --- --- --a --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --g --- --- --- --- --- --- --a --- --- --- ---
CHsc (07/96)    --- --- --- --- --- -G- --- --- --a --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --g --- --- --- --- --- --- --a --- --- --- ---
DHcR (03/97)                                                                                                                -- --- --- --- --- ---
DHcDNA                                                                                                                      -- --- --- --- --- ---

                ________________H1_____________                                                                  ___________H2_________
                                  __________CDR1_________                                                        ___________________CDR2_________
                                  30  31                                  40                                      50      52  a
V5-51UK         GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT GAC TCT
V5-51           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
AHsc (11/94)    --- --- --G --- --- -A- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- G-- --- --- --- --- ---
BHcR (12/95)    --- --- --G --- --a -A- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -AC --- --- G-- --- --- --- --- --- ---
CHsc (07/96)    --- --- --G --- --a -A- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -AC --- --- G-- --- --- --- --- --- ---
DHcR (03/97)    --- --- --G --- --- -A- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- G-- --- --- --- --- ---
DHcDNA          --- --- --G --- --- -A- -T- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- G-- G-- --- --- --- --- ---

                ___
                _____________CDR2_____________________
                                  60                                  70                                      80      82  a   b   c
V5-51UK         GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG
V5-51           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
AHsc (11/94)    ACG --a -A- --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- GAA --t --- --- -T- --- --- --- -A- --- --- ---
BHcR (12/95)    -CG --- --- --t --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- -CA --t --- --- --- --- --- --- -A- --- --- ---
CHsc (07/96)    -CG --- --- --t --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- -CA --t --- --- --- --- --- --- -A- --- --- ---
DHcR (03/97)    ATG --a -A- --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- GAA --t --- --- -T- --- --- --- -A- --- --- ---
DHcDNA          ATG --a -A- --t --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -T- --t --- --- GAA --t --- --- -T- --- --- --- -A- --- --- ---

                                                                ____________________________H3____________________
                                                                ____________________CDR3_____________________
                                  90                  94          D6-13           100     a  N          103     Jh5b
V5-51UK         GCC NCG GAC ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CA    T ATA GCA GCA GCT GGT                CCC TGG GGC CAG GGA
V5-51           --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --
AHsc (11/94)    --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --    - G-- -Tt --- --- ---     CAT AGT    --t ---
BHcR (12/95)    --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --    - --- -Tt --- --- ---     CAC AGT    --t ---
CHsc (07/96)    --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --g --    - --- -Tt --- --- ---     CAC AGT    --t ---
DHcR (03/97)    --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --    - G-- -Tt --- --- --
DHcDNA          --- --- --- --- --- --- --- -Tt --- -T- --- --    - G-- -Tt --- --- --
```

Abbildung 14: *Nukleinsäure-Sequenz der VκJκ-Gen-Rearrangements eines Patienten mit primär kutanem Keimzentrumszell-Lymphom in chronologischer Reihenfolge; die keimbahnidentische Sequenz ist in der erstenReihe dargestellt; SC= Einzelzelldaten; CR= Gesamt-DNA; H= Schwere Kette;*
Die folgenden Reihen bezeichnen die Subklone des Patienten; R-Mutationen werden als große Buchstaben und S-Mutationen als kleine Buchstaben dargestellt.

```
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                
                                                                                                                                
                                                                                                                
                                                                                                
                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
```

5.2.3. Nachweis von intraklonaler Diversität in unterschiedlichen Abschnitten einer Läsion

(diese Arbeit ist zusammen mit Frau Claudia Jacob entstanden)

5.2.3.1. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Die Biopsie eines 54 Jahre alten Patienten (LB) wurde untersucht, bei welchem sich 1995 juckende Knoten am Rücken manifestierten. Zwischen 1995 und 1998 entwickelte er Rezidive am Rücken. Therapeutisch wurden Exzisionen, Röntgenweichstrahlen und Immunochemotherapien (CHOP, Mabthera) angewendet. Infolge eines aggressiven Rezidivs verstarb der Patienten im Januar 2000.

Beim 2. Patienten (WS) handelte es sich um einen 84 Jahre alten Mann, welcher sich 03/1997 erstmals wegen eines ca. 8 cm durchmessenden Knoten am Kopf vorstellte, der exzidiert wurde. Bei Wiedervorstellung ein Jahr nach Exzision, befand er sich im Stadium der kompletten Remission.

Beide Patienten zeigten über 6 Monate nach Diagnosestellung keine extrakutane Beteiligung und entsprechen somit dem Kriterium eines primär kutanen B-Zell-Lymphoms.

Histologisch handelte es sich in beiden Fällen um FCCL vom diffusen Typ mit CD20+ Zentrozyten und Zentroblasten im Infiltrat. Bcl-2 war bei Patient LB negativ und bei Patient WS positiv.

Mittels Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden bei Patient LB eine 6 cm durchmessende Läsion vom Rücken und bei Patient WS die 8 cm durchmessende Läsion vom Kopf ausgewählt. Aus diesen Läsionen wurden Areale abgeteilt, welche mindestens 1 cm voneinander entfernt lagen. Die Isolierung der CD20+ Einzelzellen erfolgte aus 8 Arealen von Patient LB und 3 Arealen von Patient WS mittels hydraulischer Mikromanipulation. Es schlossen sich die PCR-Analysen für die V_H- und V_κ bzw. V_λ-Genfamilien wie im Abschnitt 4 beschrieben an.

Bei Patient LB wurde in allen 8 Arealen (53 Amplifikate) das gleiche hypermutierte Gen der schweren Kette des Immunglobulins ohne intraklonale Diversität gefunden (LBV_H4**A**). Die leichte Kette des Immunglobulins war ein λ-Gen. Hier konnten 4 verschiedene Varianten in 43 Amplifikaten gefunden werden ($LBV_\lambda3b$ **a,b,d,e**).

Insgesamt wurden in 24 Genen die leichte und die schwere Kette parallel amplifiziert. Davon zeigte sich 20x die Kombination LBV_H4**A**/$LBV_\lambda3b$**a** (Proben I, II, V, VI, VIII), 2x LBV_H4**A**/$LBV_\lambda3b$**d** (V, VI), 2x LBV_H4**A**/$LBV_\lambda3b$**e** (Probe VIII).

$LBV_\lambda3b$**b**, $LBV_\lambda3b$**e** konnten nur einmalig unter allen Sequenzen gefunden werden (Tabelle VIII).

Tabelle VIII: *Ergebnisse Patient LB*

Biopsie	Anzahl isolierter Zellen	Anzahl PCR-Amplifikate schwere Kette	V_HDJ_H-Rearrangement	Anzahl PCR-Amplifikate leichte Kette	$V_\lambda J_\lambda$-Rearrangement
I	18	5 V_H4	4 LBV_H4A	5 $V_\lambda3b$	4 LB $V_\lambda3ba$ 1 LB $V_\lambda3be$
II	18	7 V_H4	7 LBV_H4A	7 $V_\lambda3b$	7 LB $V_\lambda3ba$
III	18	4 V_H4	1 LBV_H4A	4 $V_\lambda3b$	-
IV	18	6 V_H4	6 LBV_H4A	2 $V_\lambda3b$	-
V	18	16 V_H4	16 LBV_H4A	12 $V_\lambda3b$	9 LB $V_\lambda3ba$ 1 LB $V_\lambda3bd$
VI	9	7 V_H4	6 LBV_H4A	8 $V_\lambda3b$	6 LB $V_\lambda3ba$ 1 LB $V_\lambda3bd$
VII	9	2 V_H4	2 LBV_H4A	-	-
VIII	18	6 V_H4	2 LBV_H4A	5 $V_\lambda3b$	1 LB $V_\lambda3ba$ 2 LB $V_\lambda3bb$
Summe	126	53	44	43	33

Bei Patient WS wurden 34 Amplifikate für das V_κ-Gen der leichten Kette aus 3 Arealen gewonnen. Die schwere Kette ließ sich nicht amplifizieren. Es konnten 4 verschiedene Varianten ($WSV_\kappa3$ **A,B,C,D**)

detektiert werden. Keine der Varianten konnte in mehreren Biopsien gefunden werden, in einem Areal jedoch 2 Subklone (II: WSV_κ3**A** und WSV_κ3**B**) (Tabelle IX).

Tabelle IX: *Ergebnisse Patient WS*

Biopsie	Anzahl isolierter Zellen	Anzahl PCR-Amplifikate leichte Kette	$V_\lambda J_\lambda$-Rearrangement
I	37	16	12 WS V_κ3 C
II	27	9	3 WS V_κ3 A 5 WS V_κ3 B
III	36	9	4 WS V_κ3 D
Summe	100	34	24

Die Daten der Mutationsanalysen für beide Patienten sind in Tabelle X für alle CDR's bzw. FR's zusammengefaßt, wobei nur die häufig gefundenen Gene berücksichtigt werden. Am Beispiel des Patienten WS wurde ebenfalls ein „Mutationsbäumchen" entworfen (Abbildung 16).

Tabelle X: *R/S-Ratio Patient WS*

Detektierte Gene	R/S-Ratio FR 1,2,3	R/S-Ratio CDR 1,2,3
WS Vκ3 A	**0**	**6/4 = 1,50**
WS Vκ3 B	**0**	**7/4 = 1,75**
WS Vκ3 C	**0**	**8/3 = 2,60**
WS Vκ3 D	**0**	**5/5 = 1,00**
intrinsische R/S-Ratio		
Keimbahngen IGKV3-20*1	**391/127 = 3,08**	**172/51 = 4,61**

5.2.4. Diskussion

Die Mikromanipulation und Einzelzell-PCR sind sensible Methoden zur Analyse zellindividueller Gensequenzen. Nachteilig ist jedoch, daß mit diesen Methoden nur relativ kleine Areale des Gewebes untersucht werden können.

In allen 3 untersuchten Fällen erbrachten die Untersuchungen einzelner Biopsien keinen Hinweis auf eine intraklonale Diversität. Nur die Möglichkeit der Analyse von weiteren Hautbiopsien bzw. mehreren Gewebeabschnitten ergab den korrekten Befund von intraklonaler Diversität. Damit konnten diese Lymphome als Keimzentrumszell-Lymphom klassifiziert werden.

Durch Konstruktion eines „Mutationsbäumchens" gelang der Nachweis, daß die Tumorzellen des Patienten UK im Infiltrat des retrobulbären Raumes eine Subpopulation (D) einer früheren Subpopulation (A) sind (Abbildung 15). Der Nachweis von zunehmend mutierten Genen (Subklon A zu D) ist ein Hinweis dafür, daß die Mutationen in den Tumorzellen stattfinden.

Bei beiden Patienten LB und WS existieren intraklonale Mutationen auf dem Gen der leichten Kette, welche jeweils 4 Subpopulationen bilden. Wird ein „Mutationsbäumchen" konstruiert, hier am Beispiel des Patienten WS, läßt sich die wahrscheinliche Folge der Mutationen darstellen. Die intraklonal diversen Gene bestehen nebeneinander in einer Läsion, jedoch teilweise in räumlich abgetrennten Bereichen. Dieser Befund läßt auch hier das Vorhandensein einer gemeinsamen Vorläuferzelle X vermuten, was schematisch in Abbildung 16 dargestellt ist. Ob es sich hierbei um präformierte Subklone oder über ongoing mutations entstandene Subpopulationen handelt, kann in diesen Untersuchungen nicht geklärt werden.

Ähnliche Phänomene konnten auch in nodalen follikulären Lymphomen und in MALTomen gezeigt werden. (Bahler DW, Proc Natl Acad Sci U S A, 1992; Zhu D, Br J Haematol, 1994; Du M, Leukemia, 1996).

Mittlerweile ist bekannt, daß in Lymphomen eine generelle Möglichkeit für somatische Mutationen verschiedener Gene bestehen bleibt. In diffusen großzelligen nodalen B-Zell-Lymphomen wurden in der Mehrzahl der untersuchten Fälle Mutationen auf den Genen PIM1, PAX5, cMyc, bcl-6 und ARHH gefunden (Pasqualucci L, Nature, 2001). Die Mutationsfrequenz ist dabei mit 9% in den Tumorzellen wesentlich höher als bei physiologischen B-Zellen mit 4% (Klein U, Blood, 1997).

Ob es sich bei diesen Mutationen um einen antigenselektierten Prozeß handelt, wurde mit den Methoden von Chang and Casali, 1997 und Shlomchik, 1987 berechnet (Chang B, Immunol Today, 1994; Shlomchik MJ, Proc Natl Acad Sci U S A, 1987). Die R/S-Ratio und der intrinsic R/S-Ratio, welche für die FR's und für die CDR's getrennt vorgenommen wird, ergab Unterschiede. Dabei ist die R/S-Ratio des Patienten UK für die CDR's mit 5 höher als die intrinsic Ratio von 3.6. und für die R/S-Ratio für die FR's mit 2 niedriger als die intrinsic Ratio von 3.4. Für die Patienten LB und WS ist die R/S-Ratio für FR und CDR's niedriger als in der kalkulierten R/S-Ratio. Den Modellen von Chang und Shlomchik zufolge, würde bei Patient UK die antigene Selektion möglich sein, bei den Patienten LB und WS jedoch nicht.

Die Methode der Mutationsbeurteilung sollte mit Vorsicht verwendet werden, da es sich 1. um eine statistische Berechnung handelt, da 2. nicht alle Abschnitte der CDR's, welche durch Kabat, 1971 definiert werden, an der Antigenbindung beteiligt sind (Kabat EA, Ann N Y Acad Sci, 1971) und da 3. unbekannt ist, welche Mutation entscheidend für die Affinität an ein Antigen ist (Rudikoff S, Proc Natl Acad Sci U S A, 1982; Bruggemann M, EMBO J, 1986; Kersten B, Exp Clin Immunogenet, 2001) und es 4. Anhaltspunkte dafür gibt, daß die FR's ebenfalls einen Einfluß auf die Affinität des Antikörpers haben können (Hillson JL, J Exp Med. 1993; Foote J, J Mol Biol, 1992).

Auch die stets negativen Staginguntersuchungen weisen darauf hin, daß die extrakutane Manifestation des Patienten UK erst viele Jahre nach den kutanen Läsionen auftrat. Bemerkenswert ist, daß die Tumorzellen im retrobulbären Infiltrat nur mit Hilfe von spezifischen Primern nachgewiesen werden konnten. Die Einzelzellanalyse ergab ausschließlich polyklonale Infiltrate. Möglicherweise wird die Zusammensetzung des Infiltrats, bei welchem polyklonale Zellen überwiegen, durch ein verändertes Mikromilieu, z.B. den Einfluß von Zytokinen, verursacht (Asadullah K, Exp Dermatol, 2000).

Bezugnehmend auf die Fragestellungen unter 5.2.1. muß festgestellt werden, daß der sichere Ausschluß von intraklonaler Diversität weder mit Untersuchung einer einzelnen Biopsie noch durch Amplifikation von nur einer Kette des Immunglobulingens erreicht werden kann.

Dabei konnten Beispiele demonstriert werden, bei welchen eine einzige Tumor-B-Zell-Subpopulation in einem untersuchten Areal vorhanden war. Weitere Subpopulationen wurden erst bei Analyse anderer Areale der gleichen Läsion bzw. in räumlich oder zeitlich verschiedenen Läsionen gefunden.

Durch den Nachweis von intraklonaler Diversität können die primär kutanen Lymphome (FCCL und GCBCLL) auch bei molekularbiologischer Betrachtungsweise als Keimzentrumszell-Lymphome eingeordnet werden.

Abbildung 15:

Klonale Expansion von B-Lymphozyten in 3 verschiedenen Biopsien (Patient UK)

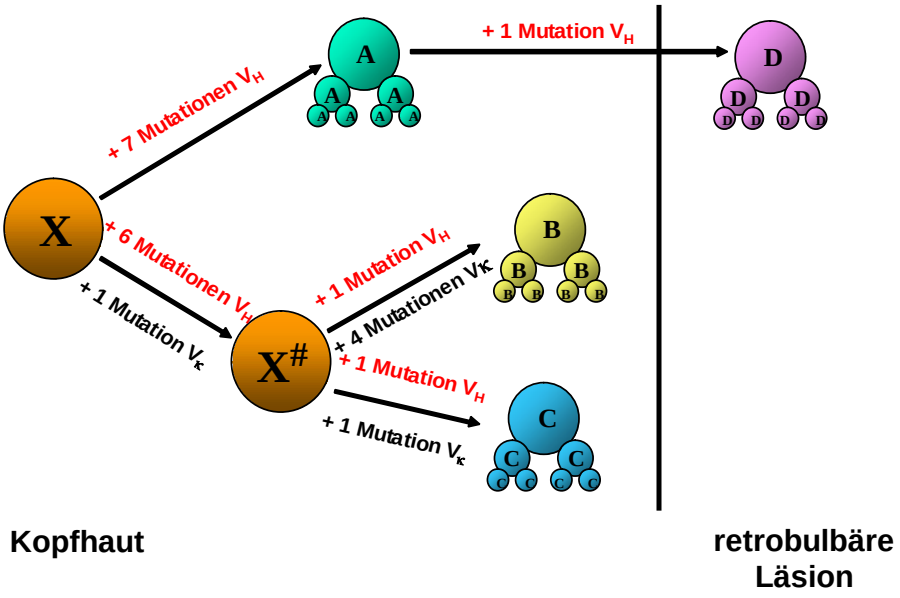
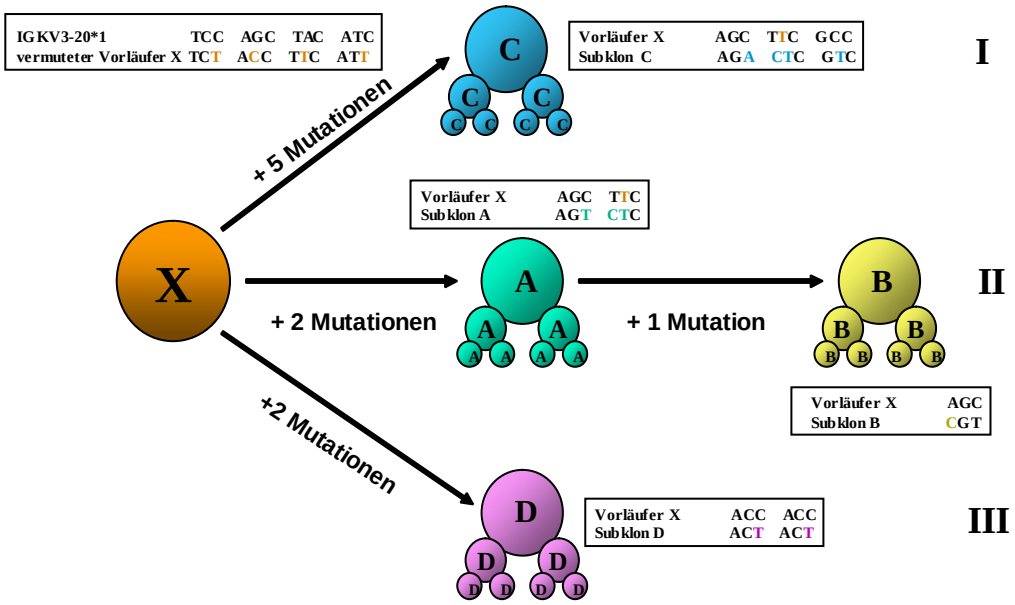


Abbildung 16:

Klonale Evolution von Tumor- B-Zellen aus 3 Arealen einer Biopsie



5.3. Untersuchung reaktiver B-Lymphozyten in T-Zell-Lymphomen

5.3.1. Hintergründe und Fragestellungen

Die Mehrzahl der primär kutanen Lymphome gehört zu den T-Zell-Lymphomen, wobei am häufigsten die Mykosis fungoides auftritt. Obwohl bei den primär kutanen T-Zell-Lymphomen die Veränderungen der malignen T-Zelle im Vordergrund der Diagnostik stehen, kann häufig ein unterschiedlich umfangreiches Infiltrat an B-Zellen in der Haut nachgewiesen werden. In einigen Läsionen formieren sie sich zu Keimzentrumsstrukturen und sitzen dann unterhalb des eigentlich typischen Infiltrates des kutanen T-Zell-Lymphoms, in anderen Fällen sind die B-Zellen dem subepidermalen bandförmigen Infiltrat locker untermischt. Morphologisch kann es sich um Plasmazellen, aber auch Zentrozyten und Zentroblasten handeln.

Bezüglich der Charakterisierung der infiltrierenden B-Zellen in Läsionen von Mykosis fungoides und pleomorphem T-Zell-Lymphom ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welches Mutationsmuster im rearrangierten Immunglobulingen weisen die individuellen B-Zellen in Läsionen der Mykosis fungoides und im pleomorphen T-Zell-Lymphom auf?
- Wo sind diese B-Lymphozyten in die physiologsiche Entwicklung einzuordnen?
- Mit welchem B-Zell-Kompartiment sind die infiltrierenden B-Zellen in primär kutanen T-Zell-Lymphomen vergleichbar?

5.3.2. B-Zellen im Infiltrat von Mykosis fungoides Läsionen (Förste N, Clin Exp Immunol, 1997)

5.3.2.1. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Für die Untersuchungen wurden 2 Bioptate der Haut von Patienten mit Mykosis fungoides im Plaquestadium (TNM Stadium IB) verwendet. Histologisch zeigte sich ein subepidermal gelegenes bandförmiges Infiltrat, in welchem sich die kleinen Lymphozyten mit cerebriformem Kern dominierten. Einige dieser Lymphozyten verhielten sich epidermotrop und bildeten die charakteristischen Pautrier'schen Mikroabszesse. In einer Patientin (I) waren dem Infiltrat CD30+ T-Zellen untermischt. Die Mykosis fungoides Erkrankung dieser Patientin transformierte in ein pleomorphes T-Zell-Lymphom mit hoher Proliferationsrate der Lymphozyten. Dem Infiltrat beider Proben waren einzelne B-Zellen untermischt, welche an der Basis nestförmige Ansammlungen bildeten.

Mit Hilfe der beschriebenen Technik der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden insgesamt 91 CD20+ B-Zellen isoliert und mittels Einzelzell-PCR hinsichtlich ihres Immunglobulin-Schwerketten-Rearrangements analysiert.

In 13/58 B-Zellen (Patient 1: 24%) und in 8/33 B-Zellen (Patient 2: 22%) konnten PCR-Produkte für das V_HDJ_H-Gen-Rearrangement generiert werden. Es wurden 9 V_H3-Gene (3x V_H3-30, 2x V_H3-8, 2x V_H3-21, 1x V_H3-21, 1x V_H3-YAC-4), sieben V_H4-Gene (2x V_H4-34, 1x $V_H4.16$, 1x VIV-4, 1x DP71-Rb, 1x DP71-RBm, 1x H10), 3 V_H5 Gene (2x DP73, 1x V_HVMW/V_HVRG) und 2 V_H1-Gene (1x DP-88, 1x DP75). Alle gefundenen Gene waren potentiell produktiv, d.h. sie enthielten weder ein Stop-Codon, noch waren sie „out-of-frame". (Förste, Clin Exp Immunol. 1997, Table I, Figure I)

Bei der Analyse der CDR3 konnte in keinem Fall ein identisches Gen gefunden werden. Demzufolge wurden keine klonalen Zellen in den Läsionen der Mykosis fungoides nachgewiesen. Alle CDR-3-Regionen enthielten D-Gene. Ein Genrearrangement enthielt 2 D-Gene. Das D-21-9 Gen wurde von 3 Zellen verwendet. In sieben Zellen wurde ein J_H-6 Gen, in sechs Zellen ein J_H4-Gen, in vier Zellen ein J_H5-Gen, in zwei Zellen ein J_H3-Gen und in jeweils einer B-Zelle ein J_H1- bzw. J_H2-Gen verwendet.

8/21 Genen waren weitgehend keimbahnidentisch (Homologie > 98,5%). 13 Gene zeigten Mutationen in mehr als drei Positionen. Die R/S-Ratio wurde für die Keimbahngene (kalkulierte R/S-Ratio) und die gefundenen Gene separat in CDR's und FR's berechnet und verglichen. Die Werte der R/S-Ratio der FR's (1.6 versus kalkuliert 3.1) und der CDR's (3.2. versus kalkuliert 5.7) waren niedriger als erwartet.

5.3.3. B-Zell-Repertoire in einem primär kutanen pleomorphen T-Zell-Lymphom (Golembowski S, J Cutan Pathol, 1999)

5.3.3.1. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Ein 61 jähriger Patient stellte sich mit indolenten subkutanen Knoten am Rücken vor, welche sich im Laufe von drei Jahren entwickelt hatte. Diese Hautveränderungen waren zunächst spontan regredient, zeigten jedoch später ein rasch fortschreitendes Rezidiv. Eine extrakutane Beteiligung der Erkrankung konnte ausgeschlossen werden.

Histologisch stellte sich ein dermales, teils periadnexal orientiertes lymphohistiozytäres Infiltrat dar, welches aus mittelgroßzelligen oder großen lymphoiden Zellen und aus großen blastenähnlichen Zellen bestand. Die immunhistochemische Markierung ergab eine Gleichverteilung von B- zu T-Lymphozyten im Verhältnis 1:1. Die B-Lymphozyten formierten sich unterhalb des T-Zell-Infiltrates in Form von keimzentrumsähnlichen Strukturen. Das CD30-Molekül wurde von ca. 20% der T-Zellen und von einzelnen großen atypischen Zellen exprimiert, welche sich innerhalb der T-Zell-Zone des Infiltrates befanden. Die Markierung dieser Zellen mit dem Marker Anti-CD-79a, welcher für Plasmazellen charakteristisch ist, ließ den Schluß zu, daß es sich hierbei um B-Lymphozyten handelte. In der Untersuchung der bulk-DNA aus dem Biopsiematerial konnte ein klonales Rearrangement für das TCR-γ –Gen und ein polyklonales Amplifikat für die IgH-Gene nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der beschriebenen Technik der Mikromanipulation wurden CD79a+ Zellen aus zwei unabhängigen keimzentrumsähnlichen Strukturen (GC1, GC2) in der tiefen Dermis und einzelne in der T-Zell-Zone liegende große atypische CD30+ Zellen isoliert und anschließend mit der Einzelzell-PCR hinsichtlich ihres Schwerketten-Immunglobulingens untersucht.

Es wurden 42 B-Zellen aus den keimzentrumsähnlichen Strukturen (GC) isoliert. Davon konnten 7 V_H-Gene in 5 B-Zellen aus GC1 und 9 V_H-Gene in 8 B-Lymphozyten aus GC2 amplifiziert werden. In 3 Zellen wurden 2 V_H-Gene rearrangiert, wobei jeweils ein Gen ein Stop-Codon enthielt und damit nicht produktiv sein konnte. In einer Zelle entstand das Stop-Codon infolge eines Frameshift, in zwei Zellen infolge eines Nukleotidaustausches. Aus der T-Zell-Zone wurden 12 B-Zellen isoliert, wobei 5 PCR-Produkte in 5 Zellen amplifiziert wurden. Alle 5 Gene der CD30+ Zellen waren potentiell produktiv (Golembowski, J Cutan Pathol, 1999).

Die CDR3-Region war in keinem Gen idententisch. Es handelte sich demzufolge um polyklonale B-Zellen.

Insgesamt wurden 7 verschiedene V_H3-Keimbahngene (3x DP46, 2x DP47, je 1x COS3/D, VM3-8, DP58, DP48, DP54 und V_H3-64); 4 verschiedene V_H4-Keimbahngene (je 1x DP71, V_H4-34, DP78 und V_H4.30), 2 V_H1-Keimbahngene (2x DP 14, 1x DP25) und 2 V_H5-Keimbahngene (2xDP73, 1xV_H32S) verwendet.

Bezugnehmend auf die Abbildungen Fig.3 und 4 der Arbeit von Golembowski et al., J Cutan Pathol, 1999, kann hinsichtlich der Mutationsanalyse folgende Zusammenfassung getroffen werden: Die

Mehrzahl der B-Lymphozyten in den Keinzentrumsähnlichen Strukturen (17/21) und die großen atypischen CD30+ Zellen aus der T-Zell-Zone (5/5) zeigten eine Sequenzhomologie mit den entsprechenden Keimbahn-V_H-Genen von >98%. Ein unmutiertes V_H-Gen war nicht produktiv.
In den 4 Zellen mit den mutierten Genen wurden 2x V_H4-, 1x V_H1- und 1x V_H3-Keimbahngene für das V_HDJ_H-Rearrangement verwendet. Zwei der mutierten Gene waren nicht produktiv, die anderen beiden Gene potentiell produktiv. Die Mutationsanalyse ergab folgende R-Mutationen: MW19$_H$3 5/9 in den CDR's, in Zelle MW52$_H$1 3/4 in den CDR's und 1/4 in den FR's, MW19$_H$4 3/4 in CDR2, MW30$_H$4 6/11 in den CDR's.

5.3.4. Diskussion

Im Infiltrat primär kutaner T-Zell-Lymphome können regelmäßig B-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei quantitativ individuell große Unterschiede bestehen. Teilweise liegen die B-Lymphozyten als einzelne Zellen dem T-Zell-Infiltrat untermischt, teilweise formieren sie sich zu keimzentrumsähnlichen Strukturen, meist unterhalb des eigentlichen Tumorzell-Infiltrates (Boehncke WH, Acta Derm Venereol, 1989; van der Putte SC, Am J Dermatopathol, 1989). Ihre funktionelle Bedeutung ist weitgehend unbekannt. Eine Korrelation zum klinischen Verlauf des T-Zell-Lymphoms wurde nicht gefunden. In gesunder Haut befinden sich keine B-Lymphozyten in der Dermis und Epidermis.
Die Analyse des verwendeten Keimbahngen-Repertoires und die Mutationsanalyse von B-Lymphozytengenen kann Auskunft über ihr Entwicklungsstadium geben. In der Regel entsprechen keimbahnidentische Gene naiven B-Zellen, welche bisher keinen Kontakt zu Antigenen hatten, mutierte Gene können sich dagegen gerade in der Phase der Keimzentrumszellreaktion in Kontakt mit Antigenen befinden oder Plasmazellen darstellen, deren Mutationsphase abgeschlossen ist (siehe auch Abschnitt 3). Die Zusammensetzung des B-Zell-Repertoires kann über diese Analysen möglicherweise Auskunft über die Situation im Tumorinfiltrat geben, welche beispielsweise durch die Zytokinproduktion von Tumor-Lymphozyten und reaktiven Zellen beeinflusst wird.
In beiden Arbeiten, Analyse von Immunglobulingenen in Läsionen der Mykosis fungoides und in einem pleomorphen T-Zell-Lymphom (Förste N, Clin Exp Immunol, 1997; Golembowski S, J Cut Pathol, 1999), wurden erwartungsgemäß polyklonale B-Zellen nachgewiesen, was sich in nichtidentischen CDR3-Regionen der einzelnen Gene zeigt. Dieser Befund läßt sich in der immunhistochemischen Markierung nachvollziehen, wobei die κ- und die λ-Kette in den B-Lymphozyten zu gleichen Teilen exprimiert wurde. Die Keimbahngene der größten V_H3-Gen-Familie wurden am häufigsten (9/21:43%) nachgewiesen, gefolgt von V_H4 (7/21), V_H5 (3/21) und V_H1 (2/21). Keimbahngene der V_H2- und V_H6-Familie wurden in den hier analysierten Zellen nicht verwendet. J_H6 (7/21: 33%) und J_H4 (6/21: 28%) wurden am häufigsten gefunden. Sowohl das „usage" der V_H-, als auch das der J_H-Keimbahngene in den B-Lymphozyten im Infiltrat der Mykosis fungoides spiegeln die Situation im peripheren Blut wider (Brezinschek HP, J Immunol, 1995; Matsuda F, Nat Genet, 1993; Cook GP, Nat Genet, 1994). Allerdings konnten in diesen Untersuchungen keine biallel rearrangierten V_HDJ_H Gene nachgewiesen werden. Die analysierten Gene waren alle potentiell produktiv. Im peripheren Blut werden häufiger beide Allele rearrangiert, wobei dann ein Gen nicht produktiv ist (Brezinschek HP, J Immunol, 1995; Guigou V, Mol Immunol, 1990). Kritischer ist zu bemerken, daß die Anzahl der untersuchten Gene für eine statistische Analyse unzureichend ist. Die Gene V3-30/DP-49, welche in 3/21 V_HDJ_H-

Rearrangements gefunden worden sind, werden häufiger in B-Zellen verwendet, welche Autoantikörper exprimieren (Winkler TH, Eur J Immunol, 1992; Pascual V, J Clin Invest, 1990; Stewart AK, Immunol Rev, 1992).

35% (8/21) der V_H-Gene waren zu > 98% keimbahnidentisch, darunter 5 V_H4- und 2 V_H5-Gene. Auch dieser Befund entspricht der Situation im peripheren Blut (Brezinschek HP, J Immunol, 1995). Die V_H4-Gen-Familie enthält 15 funktionelle Gene, wovon 4 Gene häufiger mit Autoantikörper produzierenden B-Zellen assoziiert sind (Pascual V, Arthritis Rheum, 1992). Auch das Fehlen von somatischen Mutationen in V_H-Genen von autoantikörperproduzierenden B-Lymphozyten ist häufig (Pascual V, J Immunol, 1991). Obwohl die hier aufgeführten Untersuchungen keinen Schluß über eine Autoantikörperfunktion der B-Zellen in Mykosis fungoides-Läsionen zulassen, könnte die Beobachtung fehlender Mutationen in den V_H-Genen eine Verbindung zu nachgewiesenen erhöhten Autoantikörper-Titern bei MF-Patienten vermuten lassen. Die R/S-Ratio in den FR's der mutierten Gene (13/21) liegt niedriger als die kalkulierte R/S-Ratio, was nach Chang und Casali als Indikator der funktionellen Selektion von B-Zellen zu werten ist (Kocks C, Annu Rev Immunol. 1989). Eine höhere R/S-Ratio als kalkuliert würde zu funktionell ungünstigen Konformationsänderungen im Protein des Immunglobulins führen und damit die Antikörperaffinität zum Antigen senken (Kocks C, Annu Rev Immunol, 1989). Die R/S-Ratio in den CDR's ist höher als in der kalkulierten R/S-Ratio erwartet. Das spricht für eine durch das Antigen getriggerte Selektion der B-Zellen (Chang B, Ann N Y Acad Sci, 1995). Allerdings sollten diese Berechnungen mit Vorsicht betrachtet werden, da auch hochaffine Antikörper mit einer niedrigen R/S-Ratio ihrer CDR's gefunden werden konnten und sehr hohe R/S-Ratio's in nichtproduktiven Genen nachgewiesen wurden (Pascual V, Arthritis Rheum, 1992; Pascual V, J Immunol, 1991; Allen D, EMBO J, 1988). Sowohl das Vorkommen von naiven B-Lymphozyten (unmutierte Gene) als auch von Antigen selektionierten B-Zellen (mutierte Gene) spiegelt die Situation im peripheren Blut wider. Es kann vermutet werden, daß die B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut in die Läsionen der Mykosis fungoides einwandern. Möglicherweise werden sie durch die Zytokinmuster, welche durch die Tumorzellen der Läsion verursacht werden, beeinflußt.

In lymphoproliferativer Erkrankungen z.B. den MALTomen und primär kutanen pleomorphen T-Zell-Lymphomen, aber auch in nichtmalignen Erkrankungen wie z.B. dem Lupus erythematodes, werden keimzentrumsähnliche Strukturen in Hautläsionen gefunden (Berek C, Immunol Rev, 1988). Zur Analyse der V_HDJ_H-Rearrangments wurden B-Lymphozyten aus 2 GC-Strukturen und große CD30+ B-Zellen, welche im T-Zell-Infiltrat vereinzelt vorkamen, isoliert. In 13/16 Genen handelte es sich um nichtmutierte V_HDJ_H-Rearrangements. Alle analysierten V_HDJ_H -Gene zeigten eine individuelle CDR3, weshalb die Zellen als polyklonale B-Lymphozyten eingeordnet werden. Der Nachweis eines polyklonalen, überwiegend unmutierten B-Zell-Repertoires entspricht der Situation im Lymphknoten (Bryant E, Cancer, 1982). Dabei prolifierieren polyklonale aktivierte B-Zellen mit nichtmutierten V_H-Genen in der dunklen Zone eines initialen Lymphknotens. Während der Affinitätsreifung der B-Lymphozyten sammeln sich somatische Mutationen in den V_HDJ_H-Gen-Rearrangements an. Die B-Zellen wandern in die helle Zone des Lymphknotens ein. Dort expandieren sie mit Hilfe der T-Lymphozyten und in räumlicher Nähe zu den dentritischen Zellen (Pascual V, J Immunol, 1993; Brezinschek HP, J Immunol, 1995; Pascual V, J Exp Med, 1994). In unserer Untersuchung entsprechen die B-Lymphozyten hinsichtlich ihres Mutationsmusters den B-Lymphozyten in der dunklen Zone des Lymphknotens. Entweder befinden sich diese B-Zellen in einer sehr frühen Phase

der Immunantwort oder sie werden durch das Mikromilieu des T-Zell-Infiltrates stimuliert, GC-ähnliche Strukturen zu bilden. Sollten antigenvermittelte Signale eine Rolle bei der Formation der GC-ähnlichen Strukturen bilden, bleibt völlig unklar, um welche Antigene es sich handeln könnte.
Die CD30+/ CD79a+ Lymphozyten stellen eine Besonderheit des untersuchten Falles eines pleomorphen T-Zell-Lymphoms dar (Golembowski S, J Cut Pathol, 1999). Das V_HDJ_H-Gen Rearrangement von 5 Zellen zeigte produktive nichtmutierte Gene. Demzufolge gehören sie zur gleichen Population wie die Zellen in den keimzentrumsähnlichen Strukturen, wobei diese B-Lymphozyten aktiviert sind, was die starke CD30-Expression zeigt. Offensichtlich werden die aufsteigenden B-Zellen ebenso wie einige der pleomorphen malignen T-Lymphozyten durch das Mikromilieu beeinflußt, beispielsweise von Zytokinen oder vom EBV-Virus ähnlich wie in Hodgkin-Lymphomen und dem CD30+ anaplastischen großzelligen Lymphom des Lymphknotens (Winkler TH, Eur J Immunol, 1992; Cook GP, Nat Genet, 1994).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass B-Lymphozyten, welche in Läsionen von primär kutanen T-Zell-Lymphomen einwandern, in Abhängigkeit von der Entität verschiedene physiologische Situationen widerspiegeln: in der Mykosis fungoides das Repertoire des peripheren Blutes und in einem pleomorphen partiell CD30+ T-Zell-Lymphom die Situation im Lymphknoten.
Im Hinblick auf die CD30+ Zellen in T-Zell-Lymphomen, welche im Abschnitt 6. detailierter dargestellt werden, scheint es sich auch hier um eine weitreichende Stimulierung von reaktiven Zellen und Tumorzellen zu handeln.

6. CD30+ Zellen in primär kutanen Lymphomen

6.1. CD30+ großzellige T-Zell-Lymphome der Haut (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2003)

6.1.1. Hintergründe und Fragestellungen

Die CD30-Expression ist ein diagnostischer Marker verschiedener lymphoproliferativer Erkrankungen, z.B. des Morbus Hodgkin, des anaplastischen großzelligen Lymphoms der Lymphknoten und der lymphomatoiden Papulose (Stein H, Blood, 1985; Schwab U, Nature, 1982; Willemze R, Blood, 1997; Willemze R, J Am Acad Dermatol, 1993; Falini B, Blood, 1995; Bekkenk MW, Blood, 2000; Smith CA, Cell, 1993; Gruss HJ, Ann Oncol, 1996; Willemze R, Ann Oncol, 2000). Im Gegensatz zu den nodalen Lymphomen haben primär kutane Lymphome mit CD30-Expression eine bessere Prognose (Willemze R, Blood, 1997; Willemze R, J Am Acad Dermatol, 1993; Bekkenk MW, Blood, 2000; Tilly H, Blood, 1997; Falini B, Blood, 1999).
In der EORTC-Klassifikation für primär kutane Lymphome stellen die CD30+ großzelligen Lymphome der Haut eine eigene Entität dar. Obwohl die CD30+ primär kutanen Lymphome zu 80% einem anaplastischen und zu 20% einem pleomorphen oder immunoblastischen Typ entsprechen, ist die Prognose und die klinische Manifestation in Form von Knoten und Tumoren identisch. Die CD30+ Zellen zeigen eine noduläres Infiltrat in der Dermis und Subkutis. Die Zellen sind rund bis oval und haben einen irregulär geformten Kern mit prominenten Nukleoli und reichlich Zytoplasma. Die großen CD30+ Zellen sind CD4+ und können einen Verlust der pan-T-Zell-Marker CD2, CD3, CD5 aufweisen. In der bulk-DNA kann ein klonales Gen-Rearrangement für den T-Zell-Rezeptor-γ amplifiziert werden. Bisher wurde davon ausgegangen, daß die CD30+ Zellen identisch mit den Tumorzellen sind, was

bisher jedoch nicht nachgewiesen wurde (Willemze R, Blood, 1997). Folgende Fragestellung ergibt sich daraus:

Welcher Zusammenhang besteht zwischen morphologisch großen, phänotypisch CD30+ Zellen und der klonalen Zellpopulation?

6.1.2. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Es wurde Biopsiematerial von 4 Patienten mit einem primär kutanen CD30+ großzelligen Lymphom der Haut untersucht. Bei Diagnosestellung bestand bei keinem der Patienten eine extrakutane Beteiligung des Lymphoms. 2 Patienten (I, III) verstarben 3 Jahre bzw. 19 Monate nach Auftreten der ersten Hautveränderungen; 1 Patient befindet sich seit 6 Monaten im Zustand kompletter Remission (IV), 1 Patient zeigt seit 2 Jahren rezidivierende, jedoch nicht letal bedrohliche Rezidive der Erkrankung (II). Therapeutisch erfolgten Exzisionen, Radiatio, Interferon-Behandlungen, Chemotherapien und Vakzinierungstherapien.

Die histologische Untersuchung ergab den Befund eines CD30+ großzelligen Lymphoms in allen 4 Fällen, wobei Patient III zu Beginn der Erkrankung überwiegend mittelgroßzellige CD30+ Lymphozyten im Infiltrat aufwies. Die atypischen Lymphozyten der Patienten I und II hatten einen CD3-, CD4+, CD30+ Phänotyp, die der Patienten III und IV waren CD3-, CD4- und CD30+ große atypische Zellen (Abbildung17).

Mit Hilfe der beschriebenen Methode der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden CD30+ große Zellen aus der Haut bei allen 4 Patienten sowie aus dem Blut von Patient III isoliert und anschließend mit den Primern für das TCR-γ-Gen amplifiziert und sequenziert. Unterstützend erfolgte die Amplifikation des TCR-Gens mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Primern aus der Bulk-DNA der jeweiligen Biopsie.

Die Mehrheit der CD30+ Zellen hat ein identisches Rearrangment für das TCR-γ-Gen bei allen 4 Patienten (Patient I: 81,8%; Patient II: 81,5%; Patient III: 74%, Patient IV: 78,2%). Eine Ausnahme stellte die Probe IIIa des Patienten III dar, bei welcher lediglich 18,2% der CD30+ Zellen ein identisches Rearrangment des TCR-γ-Gens zeigten (Tabelle 10).

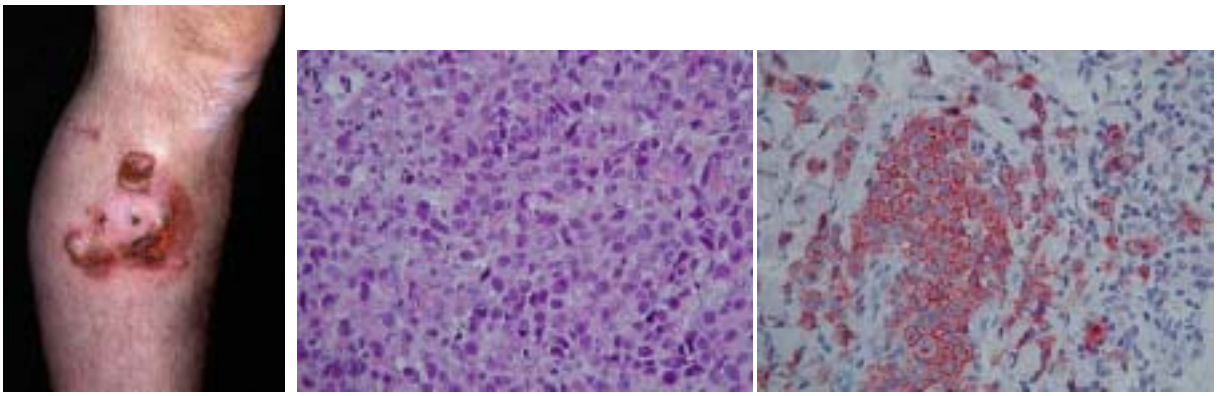
Tabelle X: *Ergebnisse der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR für das TCR-γGen-Rearrangements und CGH –Ergebnisse in CD30+ Zellen von Patienten mit CD30+ großzelligem Lymphom der Haut*

Patient	Kompartment	CGH-Ergebnisse**	Zellgröße der CD30+ Zellen	Anzahl der isolierten Zellen	Klonale/Gesamt-Sequenzen	Polyklonale/Gesamt-Sequenzen
I	Dermis Subkutis	Trisomie 7	mittelgroß bis groß	50	27/33 (81,8%)	6/33 (18,2%)
II	Dermis	Trisomie 7	mittelgroß bis groß	45	22/27 (81,5%)	5/27 (18,5%)
IIIa	Dermis	Kein Material	mittelgroß	36	4/22 (18,2%) (5/22*) (22,7%)	13/22 (59,1%)
IIIb	Dermis, Subkutis	Partielle Deletion 7q Trisomie 14	groß	54	17/23 (74%)	6/23 (26%)
IIIc	Blut	kein Material	groß	27	11/14 (78,6%)	3/14 (21,4%)
IV	Dermis	keine Abberation	groß	45	13/18 (72,2%)	5/18 (27,8%)

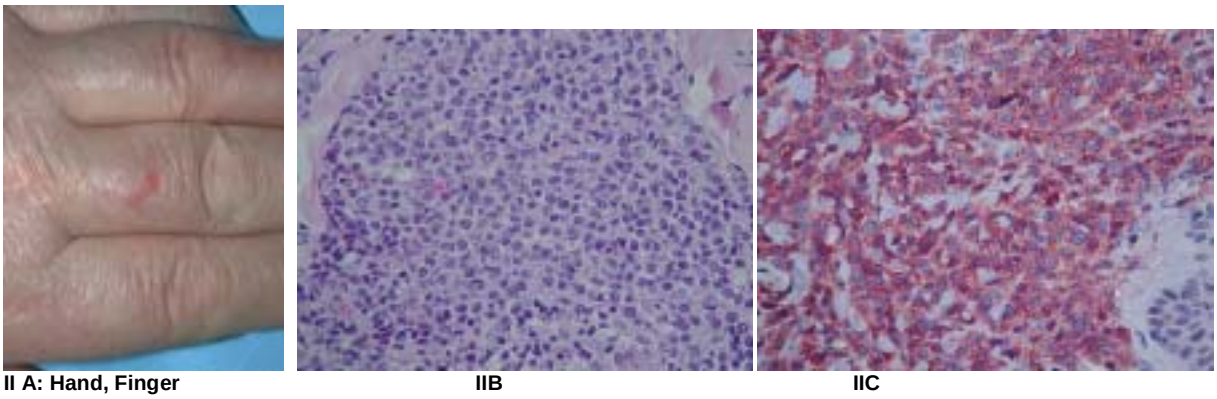
* in der Biopsie IIIa wurden in 5/22 Zellen identische TCR-γ- Gen-Rearrangments gefunden, welche nicht zur Tumorzell-Population gehörten, ** die CGH-Ergebnisse sind von der Coautorin Frau Dr. Tanja Fischer beigetragen gestellt worden

***Abbildung 17**: Klinische Manifestation, Histologie HE und Anti-CD30-Färbung*

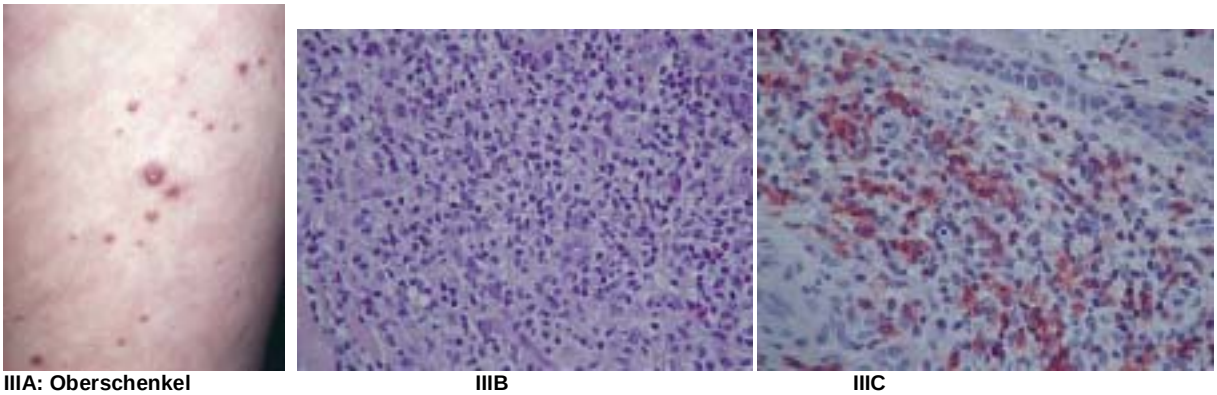
Klinische Bilder **HE-Färbung, 40x** **Anti-CD30-Färbung, 40x**



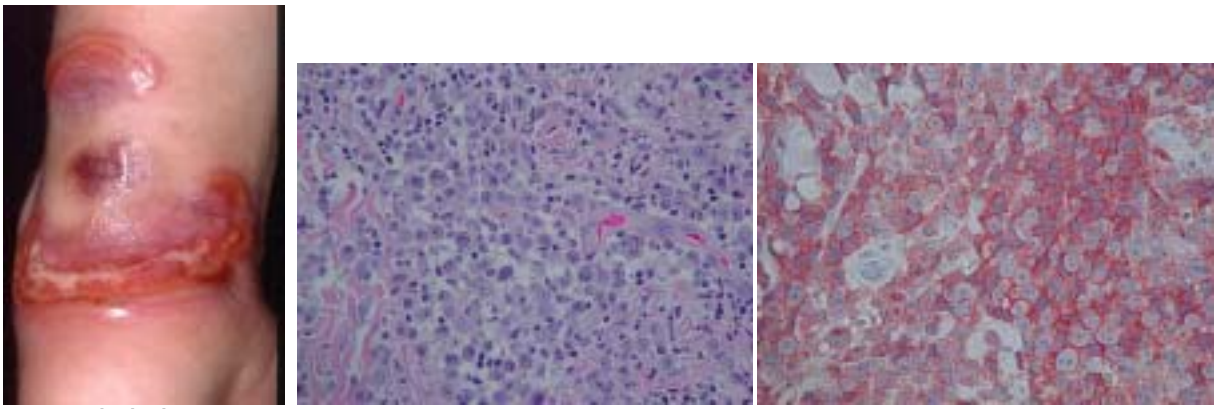
IA: Unterschenkel **IB** **IC**



II A: Hand, Finger **IIB** **IIC**

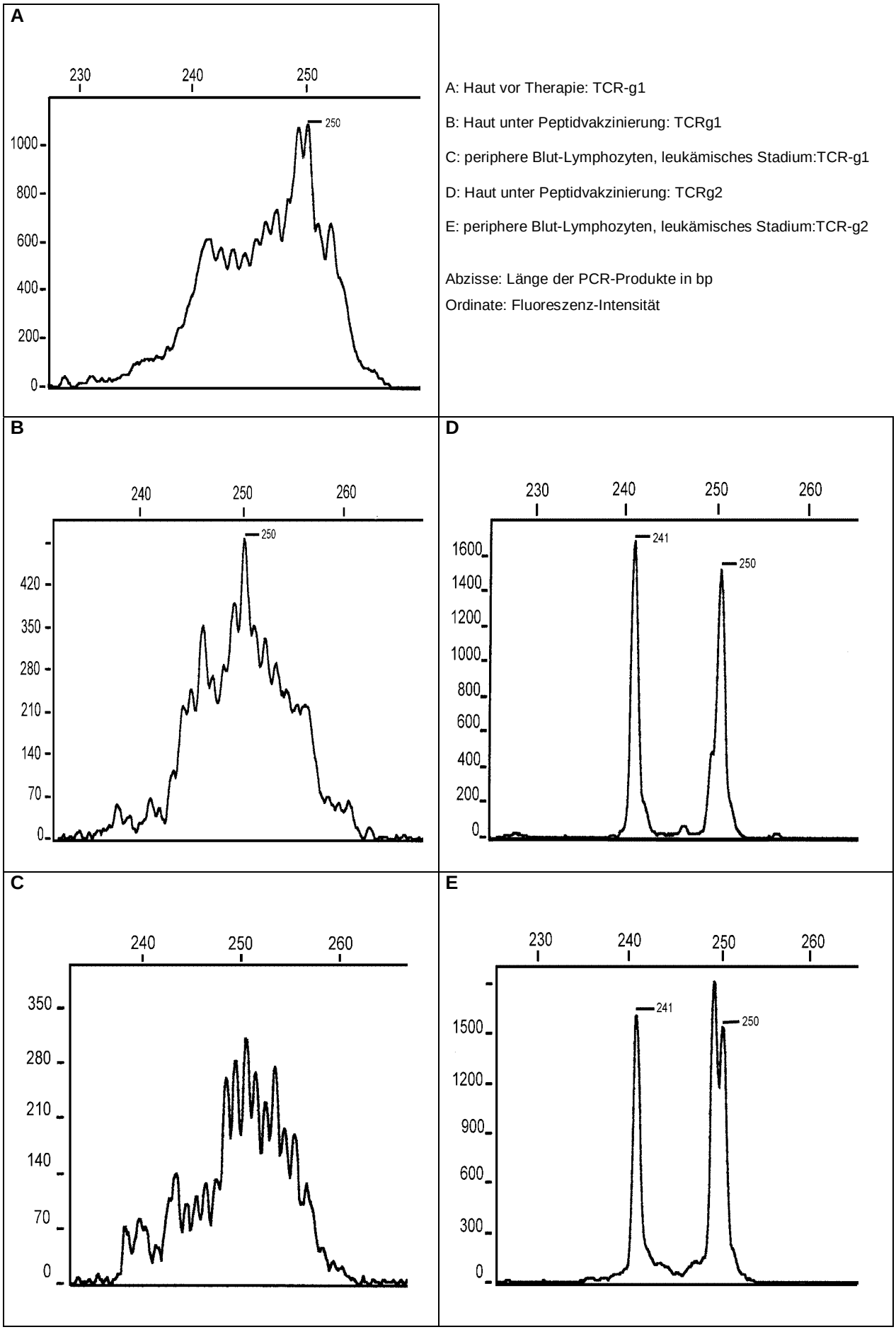


IIIA: Oberschenkel **IIIB** **IIIC**



IVA: Handgelenk, Unterarm **IVB** **IVC**

Abbildung 18: *Flureszenz Fragment-Analyse für den TCR-γ Patient III*



A: Haut vor Therapie: TCR-g1

B: Haut unter Peptidvakzinierung: TCRg1

C: periphere Blut-Lymphozyten, leukämisches Stadium:TCR-g1

D: Haut unter Peptidvakzinierung: TCRg2

E: periphere Blut-Lymphozyten, leukämisches Stadium:TCR-g2

Abzisse: Länge der PCR-Produkte in bp

Ordinate: Fluoreszenz-Intensität

Bei allen 4 Patienten wurde ein bialleles Rearrangement des TCR-γ-Gens in den Tumorzellen nachgewiesen. Bei Patient III konnte in einer Probe (IIIb) ein weiteres klonales Rearrangement gefunden werden, welches jedoch nicht in den Zellen der biallelen Population dieses Patienten nachzuweisen war. Die anderen Einzelzellen waren polyklonal, obwohl sie sich morphologisch und in der CD30-Expression phänotypisch nicht von den klonalen Zellen unterschieden.
In der FFA für Patient III konnten zwei Peaks gefunden werden, welche mit der Größe der biallelen Sequenzen dieses Patienten identisch waren (241bp, 250bp). Die Genlänge der anderen klonalen Zellinie ist mit einem transidienten Peak (251bp) in der FFA ebenfalls vereinbar (Abbildung 18).

6.1.3. Diskussion

Das CD30-Antigen, als Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, ist in die Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten involviert. Neben der physiologischen Rolle dürfte dieses Molekül eine Bedeutung bei Tumorwachstum und in -entstehung haben (Falini B, Blood, 1995; Gruss HJ, Ann Oncol, 1996; Horie R, Semin Immunol, 1998).
Wie erwartet, konnte die Tumorzellpopulation in ca. 75% unter den CD30+ großen atypischen Zellen nachgewiesen werden. Unerwartet war jedoch, daß ca. 25% dieser Zellen einer polyklonalen Zellpopulation angehörten. Ähnliche Phänomene konnten bei einer Analyse Vβ-typisierter individueller Zellen in der Mykosis fungoides nachgewiesen werden (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000). In beiden Entitäten stimmen der Phänotyp und die Morphe der bisher als typisch tumorassoziiert angesehenen Zellen nicht vollständig mit der klonalen Population überein. Die Funktion der CD30+ großen atypischen Zellen mit polyklonalem Rearrangment ist dabei unklar. Möglicherweise handelt es sich um reaktive Zellen, z.B. als zytotoxische Zellen im Rahmen der physiologischen Tumorabwehr.
Alle hier untersuchten Patienten wiesen einen CD3-Verlust bzw. teilweise CD4-Verlust auf den Tumorzellen auf. In einem Fall konnte das Auftreten dieses CD3-, CD4-Verlustes erst bei Progression des Tumorwachstums gefunden werden, wobei dann auch der Anteil an klonalen Zellen im Infiltrat zunahm. Der Verlust von Oberflächenmarkern könnte einem Escape-Mechanismus der Tumorzelle entsprechen (Bagot M, J Invest Dermatol, 2000). Die Tumorzelle ist dann nicht mehr sensibel für eine zytotoxische T-Zell vermittelte Antitumorantwort oder wird nicht mehr durch die zytotoxischen spezifischen T-Lymphozyten erkannt. Die Detektion einer zweiten transienten klonalen Population in der Probe IIIb und die dazu passende Länge eines Peaks in der FFA könnten ein Hinweis für die Existenz tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten sein, welche bei Patient III mittels eines intrazellulären Stimulationsassays mit den genutzten therapeutischen Peptiden (Mimotope) nachgewiesen wurden (Linnemann T, Ann Oncol, 2000; Linnemann T, Eur J Immunol, 2001). Möglicherweise ist diese transiente Zell-Population durch die Vakzine-Therapie induziert worden.
Der CD30 vermittelte Signaltransduktionsweg scheint eine besondere Rolle bei der Tumorentstehung und beim Tumorwachstum zu spielen. In der lymphomatoiden Papulose und auch in frühen Entwicklungsstadien der T-Lymphozyten, führt die CD30/CD30L-Interaktion zur Apoptose der betroffenen Zellen. So kommt es zur spontanen Regression der Läsion bei der lymphomatoiden Papulose (Levi E, J Invest Dermatol, 2000). Ist die Regulation gestört, kann es zu gegensätzlichen Effekten kommen und damit im Fall eines großzelligen anaplastischen CD30+ Lymphoms des

Lymphknotens zur Tumorprogression (Levi E, J Invest Dermatol, 2000; Mori M, Blood, 1999). Weitere Defekte, welche eine Apoptose von CD30+ Zellen verhindern, sind Mutationen im Gen des TGF-β Rezeptorgens (Knaus PI, Mol Cell Biol, 1996; Schiemann WP, Blood, 1999) und ein Verlust der FAS-Expression (Mori M, Blood, 1999; Bagot M, Ann N Y Acad Sci, 2001).

Im Gegensatz zu der in der EORTC-Klassifikation (Willemze R, Blood, 1997) dargestellten guten Prognose von CD30+ großzelligen Lymphomen der Haut, zeigten die hier untersuchten Patienten eine schlechte Prognose in 2 Fällen. Aus diesem Grund wurde eine CGH-Untersuchung (complementary genom hybridisation) zur Identifikation chromosomaler Abweichungen durchgeführt (Koautorin der Publikation Tanja Fischer stellte die Daten zur Verfügung), welche bei den Patienten I und II eine Trisomie des Chromosom 7 und bei Patient III eine Deletion des 7q-Chromosoms und eine Trisomie 14 ergab. Die Chromosomenaberrationen sind demnach im Infiltrat vorhanden, wobei nicht geklärt werden konnte, ob diese Zellen der klonalen oder polyklonalen Population angehörten. Ob die gefundenen Veränderungen an den Chromosomen 7 und 14 für die Tumorgenese und den Verlauf der Erkrankung relevant sind, ist bisher nicht bekannt. Die t(2;5) Translokation, welche in nodalen CD30+ Lymphomen eine wichtige chromosomale Aberration darstellt, spielt in den primär kutanen CD30+ großzelligen T-Zell-Lymphomen keine Rolle (Zoi-Toli O, Br J Dermatol, 2000; Beylot-Barry M, Blood, 1998; Li G, J Cutan Pathol, 1997). Einzelne Daten, z.B. die Mutation im TGF-ß-Rezeptorgen, bei großzelligen anaplastischen CD30+ Lymphomen des Lymphknotens, weisen jedoch auf die Zunahme von funktionell bedeutsamen genetischen Defekten in den Tumorzellen von CD30+ großzelligen Lymphomen hin.

Die Präsenz von CD30+ klonalen und polyklonalen Zellen läßt Einflüsse, z.B. Zytokine oder Superantigene, vermuten, welche zur Ausprägung der Morphe und des CD30+ Phänotyps in Tumorzellen, aber auch in reaktiven Zellen führt.

6.2. CD30+ Zellen in der lymphomatoiden Papulose (Gellrich S, in Revision in I Invest Dermatol)

6.2.1. Hintergründe und Fragestellungen

Die lymphomatoide Papulose wird in Anlehnung an die EORTC-Klassifikation als niedrig malignes Lymphom der Haut klassifiziert (Willemze R, Blood, 1997). Es ist bekannt, daß in 10% der Fälle ein Morbus Hodgkin, ein großzelliges anaplastisches Lymphom oder eine Mykosis fungoides mit der lymphomatoiden Papulose assoziiert ist (Davis T-H, N Engl J Med, 1992; el-Azhary R-A, J Am Acad Dermatol, 1994; Whittaker S, J Invest Dermatol, 1991; Wood GS, J Invest Dermatol, 1995; Wang HH, Cancer, 1999 ; Chott A, J Invest Dermatol, 1996).

Obwohl auf histologischer Ebene Korrelationen zwischen dem Auftreten bestimmter Typen dieser Erkrankung und der Entwicklung von sekundären lymphoproliferativen Erkankungen vorgenommen worden sind, ist ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Entitäten bisher nur unzureichend erforscht worden (Whittaker S, Ann N Y Acad Sci, 2001).

Wesentliche Gemeinsamkeiten zwischen der lymphomatoiden Papulose und den lymphoproliferativen Folgeerkrankungen sind das Auftreten von großen atypischen Zellen mit CD30+ Phänotyp sowie der Nachweis einer klonalen T-Zell-Population aus der bulk-DNA. Mit Hilfe der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wollten wir folgende Fragestellungen beantworten:

- Gehören die CD30+ großen atypischen Zellen einer klonalen oder polyklonalen T- oder B-Zellpopulation an?
- Gibt es einen Bezug zu Folge-Lymphomen?

6.2.2. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Insgesamt wurden kutane Läsionen von 3 Patienten mit lymphomatoider Papulose, Typ A, untersucht. Alle 3 Patienten zeigten klinisch spontan aufschießende, rasch regrediente, nekrotisch zerfallende und narbig abheilende Läsionen an der Haut. Bei Diagnosestellung konnte eine extrakutane Manifestation einer lymphoproliferativen Erkrankung ausgeschlossen werden.

Im Verlauf entwickelte nur Patient III einen Morbus Hodgkin mit Manifestation an den axillären Lymphknoten und nach dessen erfolgreicher Therapie ein großzellig anaplastisches Lymphom der Lymphknoten, an welchem er verstarb. Bei allen drei Patienten konnten klonale T-Zell-Populationen über einen längeren Zeitraum im Blut sowie in der bulk-DNA der Haut nachgewiesen werden (Tabelle 11).

Tabelle XI: *FFA-Analysen von 3 Patienten mit lymphomatoider Papulose*

Patient	Probe	Zeit	polyklonal	Kleiner Peak (bp)	Dominierender Peak (bp)
I	Blut	1/99			+ (255[1], 232[2])
	Blut	6/99			+ (242[1], 247[1],244[2])
	Haut(p)	6/99			+ (255[1], 232[2])
→	Haut (c)	6/99			+ (255[1], 232[2])
II	Blut	6/00		+ (250[1],254[1], 243[2])	
	Haut (p)*	09/00		+ (250[1], 243[2])	
→	Haut (c)*	09/00		+ (250[1])	
	Blut	12/00	+		
	Blut	03/01		+ (250[1],254[1])	+ (243[2])
	Blut	04/01		+ (250[1],254[1])	+ (243[2])
	Blut	08/01		+ (250[1],254[1])	+ (243[2])
III	Haut (p)	08/96	+		
	Blut	8/96		+ (248[2])	
	Blut	11/96	+		
	Blut	01/97		+ (248[2])	
	Haut (p)	03/97			+ (248[2], 252[2])
	Blut	04/97		+ (248[2])	
	Blut	07/97		+ (248[2])	
	Blut	08/97		+ (248[2])	
	Haut (p)	08/97			+ (248[2], 252[2])
	Lymphknoten (p)	11/97	+		
	Lymphknoten (p)	03/98			+ (248[2])
→	Lymphknoten (c)	03/98			+ (248[2], 252[2])
	Haut (p)	07/98			+ (248[2])
→	Haut (c)	07/98			+ (248[2], 252[2])
	Blut	11/98		+ (242[2])	

Die grau unterlegten Boxen zeigen die selbe Biopsie, welche zum Teil kryokonserviert (c) und zum Teil in Paraffin (p) eingebettet wurden; [1] FFA Reaktion I (Vg1-8); [2] FFA Reaktion 2 (Vg9-11); → in der Einzelzell-PCR analysierte Proben

Mit Hilfe der beschriebenen Technik der Mikromanipulation und Einzel-Zell-PCR wurden atypische CD30+ Zellen aus den Läsionen der lymphomatoiden Papulose isoliert, anschließen mittels PCR für das TCR-γ- und das IgH-Gen untersucht. Die PCR-Produkte wurden sequenziert.
Bei Patient III wurden zusätzlich CD30+ Hodgkin-Zellen aus einer Lymphknotenbiopsie isoliert und für das Immunglobulingen der schweren Kette amplifiziert.
Mittels FFA wurde bulk-DNA von Blut- und Hautproben der Patienten über einen längeren Zeitraum untersucht. Daher war bekannt, daß bei allen Patienten ein individueller persistierender T-Zell-Klon vorhanden ist.

Weil die klonalen Zellen unter den CD30+ großen atypischen Zellen erwartet wurden, sind diese Zellen einzeln isoliert und bezüglich ihrer TCR-γ-Gen-Rearrangements untersucht worden. Unerwarteterweise waren alle untersuchten CD30+ Zellen bei den Patienten I und II polyklonal (Tabelle XII). Obwohl B-Zellen aus histologischer Sicht nur in geringer Menge vorhanden waren, erfolgte auch die PCR für das IgH-Gen an CD30+ Einzelzellen. Die molekularbiologische Bestätigung des Fehlens von CD30+ B-Zellen unterstrich das Vorhandensein von polyklonalen CD30+ T-Zellen im Infiltrat der lymphomatoiden Papulose.
Um die in der FFA nachgewiesene klonale Population zu finden, wurden jetzt individuelle CD3+ kleine T-Lymphozyten untersucht. Überraschend zeigte gerade diese Population die klonalen Zellen, deren PCR-Produkt für das TCR-γ-Gen mit der Länge der gefundenen Klone in der FFA korrespondierte. Weiterhin wurde nicht nur eine klonale Population innerhalb der Läsion gefunden, sondern bei beiden Patienten noch zusätzlich klonale Zellen (Tabelle XII, Tabelle XIII).
Bei Patient III ist die wichtigste Besonderheit, daß die lymphomatoide Papulose mit einem sekundären Morbus Hodgkin und einem später folgenden anaplastischen großzelligen CD30+ Lymphom assoziiert war. Auch hier ergab die FFA über Jahre das Bestehen einer klonalen T-Zell-Population in Haut und Blut (Tabelle XI). Bei der Untersuchung der CD30+ Zellen hinsichtlich ihres TCR-γ-Gen-Rearrangements und ihres IgH-Gens wurden sowohl klonale T-Zellen als auch klonale B-Zellen innerhalb der markierten CD30+ Zellen gefunden. Dabei handelte es sich um ein bialleles T-Zell-Amplifikat, welches mit der Länge des seit langer Zeit bestehenden klonalen Peaks aus der FFA-Gesamt-DNA-Analyse übereinstimmt sowie um einen zusätzlichen T-Zell-Klon, welcher transidient in einer Läsion nachweisbar war. Auch bei Patient III konnten zusätzlich polyklonale T-Zellen, jedoch keine polyklonalen B-Zellen nachgewiesen werden. Die CD30+ B-Zellen im Lymphknoten des Morbus Hodgkin und in der Läsion der lymphomatoiden Papulose zeigten eine identische Gensequenz für die schwere Kette des Immunglobulinrezeptors (Abbildung19). Entsprechend der fehlenden intraklonalen Diversitäten im Mutationsmuster und hinsichtlich der nachzuweisenden Hypermutation des Gens, wird dieser Befund als Post-Keimzentrumszell-Lymphom eingeordnet.
Ob die nachgewiesenen permanenten T-Zell-Populationen mit dem CD30+ großzellig anaplastischen Lymphknoten in Zusammenhang stehen, konnte aus technischen Gründen nicht geklärt werden.

Tabelle XII: Charakterisierung der Proben, Histologie, rearrangierte Gene

Patient	**Biopsie**	**Morphologie der CD30+ Zellen**	**isolierte CD30+ Zellen, TCR-Analyse**	TCR-γ Sequenzen		**isolierte CD30+ Zellen, IgH-Analyse**	IgH-Sequenzen	
				polyklonal / total	**klonal / total**		**polyklonal / total**	**klonal / total**
I	Haut	mittelgroßzellig	59	35*[1] / 48 (100%)	0 / 35 (0%)	70	0*[3]	0*[3]
II	Haut	großzellig	72	25 / 25 (100%)	0 / 25 (0%)	81	1*[3]	0*[3]
IIIa	Haut	großzellig	54	10 / 18 (55%)	4 / 18 (22%) 4*[2]/18 (22%)	27	0 / 6 (0%)	6 / 6 (100%)
IIIb	Lymphknoten	H-RS	n.d.	n.d.	n.d.	27	1 / 12(8,3%)	11 / 12 (91,7%)

Patient	**Biopsie**	**Morphologie der CD3+ Zellen**	**isolierte CD3+ Zellen, TCR-Analyse**	TCR-γ Sequenzen	
				polyklonal / total	**klonal / total**
I	Haut	kleinzellig	36	3/ 13	8/13, 2/13*[4]
II	Haut	kleinzellig	36	6/17	6/17, 5/17*[5]

*[1]) in 13 Zellen wurde ein bialleles Rearrangement für das TCR-γ-Gen gefunden

*[2]) in diesen Zellen wurde ein biallelisches Rearrangment für das TCR-γ-Gen gefunden, es wurden 2 klonale T-Zell-Populationen detektiert

*[3]) Prozentangaben sind nicht sinnvoll, da zu wenige B-Zell-Sequenzen gefunden wurden

*[4]) bialleles Rearrangement für das TCR-γ-Gen, weil beide Gene innerhalb einer Zelle gefunden wurden

*[5]) möglicherweise zwei klonale Populationen, weil die beiden Rearrangments nicht in einer Zelle gefunden wurden

n.d.) nicht durchgeführt, da das Material verbraucht war

Tabelle XIII: *Klonale TCR-γ Sequenzen in der Haut der Patienten I, II, III*

Patient	Klonale T-Zell-Population	TCR-γ Gen-Rearrangement	V- Gen	V- Segment	N-Region	J -Segment	Kalkulierte Genlänge nach der Sequenzierung (bp)	Länge in der FFA*[2] (bp)
I	A	biallel	TRG V8*1	TAT TAC TGT GCC ACC TGG G	TC GAA CCG GGG G	TA TTA TAA GAA ACT CTT	255	255
I	A	biallel	TRG V10*2	TAC TAC TGT GCT GCG TGG	TCG GA	C TCT T	231	232
II	A	möglicherweise biallel *[1]	TRG V2*2	TAC TGT GCC ACC TGG GAC G	CT CCA	AAT TAT TAT AAG AAA CTC TT	251	250
II	B	möglicherweise biallel *[1]	TRG V2*2	TAC TGT GCC ACC TGG GA	T TAT ACT TTC	TAT TAT AAG AAA CTC TT	251	250
III	A	biallel	TRG V10*2	TAC TAC TGT GCT GCG TGG	GAT TAT CCC TG	A TTA TTA TAA GAA ACT CTT	251	252
III	A	biallel	TRG V10*2	TAC TAC TGT GCT GCG TGG GA	A GTC TAT CCT G	A TAA GAA ACT CTT	247	248
III	B	monoallel	TRG V10*2	TAC TAC TGT GCT GCG TGG	TCC GAC GCG G	TA TAA GAA ACT CTT	245	no

*[2] ein bp Unterschied zwischen den Genlängen der Sequenzierung und der FFA ist aus technischen Gründen möglich

*[1] möglicherweise biallel bedeutet, daß in der FFA 4 Peaks zu sehen sind, es wurde jedoch nur ein Gen einer jeden T-Zell Population amplifiziert

Abbildung 19: *Immunglobulin-Gen-Rearrangment der schweren Kette von Patient III im Vergleich zur Keimbahnkonfiguration, welche in den CD30+ Zellen der Läsion der lymphomatoiden Papulose und des Lymphknotens von Patient III zu finden waren, kleine Buchstaben: S-Mutationen, große Buchstaben: Aminosäureaustausch*

```
                                                                V - Gen
                 ____________ CDR 1 – IMGT ____________<---------------------------------------------------------- FR 2 – IMGT ---------------------------------------------------------->_____
                 30                   35                   40                   45                   50                   55
IGHV4-61*07      GTC AGC AGT GGT AGT TAC TAC . . TGG AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG TAT ATC TAT
Haut               - tc- -TG AAC --- -G- --- . . --- -CT --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --a --- --- --- --t G-A --- -T-
Lymphknoten        - tc- -TG AAC --- -G- --- . . --- -CT --- --- --- --- G-- --- --- --- --- --a --- --- --- --t G-A --- -T-

                 _______CDR 2_____________________<------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------ FR 3 – IMGT ----------------------------
                          60                   65                   70                   75                   80                   85
IGHV4-61*07      TAC AGT GGG AGC ACC . . . AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG . AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG
Haut             ATT –C- --- -A- --- . . . –-t --- --t --- --- --- --- . --- --- --- --- --- -T- A-G --- -A- --- --- --- --a
Lymphknoten      ATT –C- --- -A- --- . . . –-t --- --t --- --- --- --- . --- --- --- --- --- -T- A-G --- -A- --- --- --- --a

                 ____________________________________________________________________________________________________________ CDR 3 – IMGT _____
                             90                   95                   100                  105
IGHV4-61*07      TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA CA
Haut             --- --t --- -GA --- -C- --- T-- --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- -
Lymphknoten      --- --t --- -GA --- -C- --- T-- --- --- --- --- --- --- C-- --- --- --- --- -

                   N1- Region                DH-Gen                N2 – Region              JH-Gen

                 ____________________________________________________________________________________________________________
                                                                      110                                                  115
                                IGHD7-27*0       ACT GGG GA                          IGHJ4*02  GC TAC TTT GAC TAC TGG...
Haut                 AA                          --- C-- --                A CTG C                -- --- --- GT- ---...
Lymphknoten          AA                          --- C-- --                A CTG C                -- --- --- GT- ---...
```

6.2.3. Diskussion

Die lymphomatoide Papulose ist in der EORTC-Klassifikation und in der WHO-Klassifikation als eigene Entität aufgeführt (Willemze, Blood, 1997; Jaffe Am J Clin Pathol, 1999). Die Prognose dieser Erkankung ist mit einer 5-Jahres-Überlebenszeit von 100% ausgezeichnet, so daß die Zugehörigkeit der Erkankung zu den niedrig malignen Lymphomen zunächst fraglich erscheint. Limitiert wird die Lebenserwartung der Patienten jedoch durch die Entwicklung von assoziierten Lymphomen wie Morbus Hodgkin, CD30+ großzelliges anaplastisches Lymphom des Lymphknotens und Mykosis fungoides (Basarab T, Br J Dermatol, 1998; Christensen HK, Semin Dermatol, 1994; Bekkenk MW, Blood, 2000).

Ein weiterer Anhaltspunkt für die Zugehörigkeit der lymphomatoiden Papulose zu den Lymphomerkrankungen ist der Nachweis von klonalen T-Zellen in den Läsionen und im Blut der Patienten (Davis TH, N Engl J Med, 1992; el-Azhary RA, J Am Acad Dermatol, 1994; Whittaker S, J Invest Dermatol, 1991; Wood GS: J Invest Dermatol, 1995; Wang HH, Cancer, 1999 ; Chott A, J Invest Dermatol, 1996).

Der Zusammenhang zwischen der niedrig malignen lymphomatoiden Papulose und den hochmalignen assoziierten Zweitlymphomen (Morbus Hodgkin, CD30+ anaplastisches großzelliges anaplastisches Lymphom) ist derzeit völlig unklar. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse wird vermutet, daß es sich bei der lymphomatoiden Papulose nicht um ein einheitliches Reaktionsmuster der CD30+ Zellen handelt.

In den Patienten I und II sind die großen atypischen CD30+ Zellen polyklonale T-Zellen. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da in der Gesamt-DNA-Analyse mittels FFA ein klonales Rearrangement für den T-Zell-Rezeptor-γ nachgewiesen worden war. Aus diesem Grund wurde nun eine andere Zellpopulation in Form CD3+ kleiner T-Zellen untersucht, welche zum Teil der gesuchten, zuvor in der FFA gefundenen klonalen Population angehörten.

Der hier erhobene Befund der klonalen und polyklonalen CD3+ kleinen Lymphozyten in den Patienten I und II könnte als Bystander–Effekt verstanden werden, wobei die CD3+ Zellen aus dem Blut in das Infiltrat der lymphomatoiden Papulose-Läsion einwandern und nicht selbst für das Aufschießen der Läsionen verantwortlich sind. Die Ursache für das Auftreten von CD30+ Lymphozyten ist nicht bekannt, möglicherweise spielen Superantigene oder Zytokine eine Rolle. Nach den Untersuchungen der Gruppe um Kadin et al (Mori M, Blood, 1999; Levi E, J Invest Dermatol, 2000) unterliegen die polyklonalen CD30+ Zellen aufgrund von autoregulierender CD30/CD30 Ligand-Interaktion innerhalb kurzer Zeit der Apoptose, wobei klinisch der nekrotische Zerfall und die narbige Abheilung der Läsion imponiert. Die klonalen CD3+ Lymphozyten sind jedoch weiterhin im Blut und in ggf. neuen Läsionen zu finden. Der Übergang von polyklonalen zu klonalen Zellen ist vorstellbar bei Ansammlung von genetischen Veränderungen, welche in CD30+ großzelligen anaplastischen Lymphomen beispielsweise als t(2;5) Translokation nachzuweisen sind (Vergier B, Am J Surg Pathol, 1998). Weiterhin könnte das Auftreten von Mutationen, welches z.B. im TGF-β-Rezeptorgen nachgewiesen wurde (Schiemann WP, Blood, 1999), die fehlende FAS-Expression sowie ein Defekt in der CD30/CD30 Ligand-Interaktion (Mori M, Blood, 1999; Levi E, J Invest Dermatol, 2000) zu einer Transformation von Zellen führen, welche dann die Entstehung des CD30+

großzelligenanaplastischen Lymphoms ermöglicht. Aus welchem Reservoire (Haut, Blut, CD3+, CD30+) die Zellen dann kommen, bleibt zunächst unklar.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden Steinhoff et al nahezu ausschließlich klonale Zellen in CD30/CD2-positiven Einzelzellen in Läsionen der lymphomatoiden Papulose (Steinhoff M, Blood, 2001). Der Unterschied in den Daten legt nahe, daß verschiedene Reaktionsmuster in der lymphomatoiden Papulose existieren.

Anders als die Daten von Patient I und II konnten bei Patient III klonale CD30+ Zellen detektiert werden, welche ein TCR-γ-Gen in der gleichen Länge aufwiesen wie zuvor über Jahre in der FFA von Haut und Blut gefunden wurde. Zusätzlich ließen sich hier eine zweite klonale T-Zell-Population, eine klonale B-Zell-Population und polyklonale T-Zellen detektieren. Möglicherweise wurden die persistierenden klonalen T-Zellen bei diesem Patienten stimuliert, so daß sie sich unter der phänotypisch CD30+ Population befinden. Ob ein Zusammenhang zu dem später entstehenden CD30+ großzelligen Lymphom der Lymphknoten bestand, konnte aus technischen Gründen in diesen Untersuchungen nicht geklärt werden.

Bei der lymphomatoider Papulose wiesen die B-Zellen in der lymphomatoiden Papulose-Läsion und die Hodgkin-Zellen des Lymphknotens ein identisches Gen der schweren Kette des Immunglobulins auf. Offensichtlich können in den Läsionen der lymphomatoiden Papulose Tumorzellen der B- und der T-Zell-Reihe auftreten, ohne aggressiv zu sein, denn zum Untersuchungszeitpunkt war die Hodgkin-Erkrankung klinisch ausgeheilt und das CD30+ großzellige Lymphom des Lymphknotens noch nicht manifest. Möglicherweise handelt es sich bei den klonalen T- und B-Zellen ebenfalls um Bystander-Zellen, welche wegen eines unbekannten Stimulus in die Läsion einwandern. Da in der untersuchten Hautläsion des Patienten III weiterhin funktionell intakte CD30-positive polyklonale Zellen vorhanden sind, kann die Apoptose erfolgen und die Läsion wiederum die Regression erreichen.

Die Präsenz einer zweiten klonalen T-Zell-Population kann einerseits der Existenz von reaktiven spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten entsprechen (gegen die Hodgkin-Zelle, gegen die Tumor-T-Zellen), wofür auch die einmalige Detektion eines dem Gen gleichlangen Peaks in der FFA spricht; andererseits ist das Vorhandensein weiterer klonaler, in dem Moment der Untersuchung nicht tumorrelavanter T-Zellen vorstellbar.

6.3. Zusammenfassung der Analyse von CD30+ Einzelzellen in primär kutanen T-Zell-Lymphomen

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Einzelzell-Analyse in primär kutanen CD30+ großzelligen anaplastischen Lymphomen und in Läsionen der lymphomatoiden Papulose zeigen, daß in beiden Entitäten polyklonale Zellen einen Teil des Tumorinfiltrats bestimmen. In zwei Fällen von lymphomatoider Papulose konnte sogar ein ausschließlich polyklonales CD30+ T-Zell-Infiltrat nachgewiesen werden. Bei Betrachtung des klinischen Verlaufs könnten gerade diese polyklonalen Zellen für die Regredienz bzw. den relativ gutartigen Verlauf der CD30+ Lymphome verantwortlich sein, da sie der CD30-vermittelten Apoptose unterliegen.

Auch die prozentuale Zunahme von klonalen Zellen und die Abnahme von polyklonalen Zellen beim Progress eines primär kutanen CD30+ Lymphoms läßt sich mit dem klinischen Velauf vereinbaren.

Das Auftreten der tumorassoziierten klonalen Populationen im Infiltrat der lymphomatoiden Papulose kann als Bystander-Effekt gewertet werden, wobei die Tumorzellen aufgrund eines allgemeinen Stimulus in das Infiltrat der lymphomatoiden Papulose einwandern. Dabei können B- und T-Lymphozyten betroffen sein. Diese Bystander-Lymphozyten können mit Zweitlymphomen assoziiert sein, ohne jedoch in der Läsion der lymphomatoiden Papulose maligne Eigenschaften zu besitzen.
Die Aktivierung von CD3+ kleinen klonalen Zellen und deren Übergang in CD30+ Zellen ist vorstellbar.

Das Auftreten von weiteren klonalen T-Zell-Populationen kann mit der Erscheinung expandierender aktivierter tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen zusammenhängen. Dafür spricht das kurzzeitige Auftreten der zusätzlichen klonalen T-Zellen im Verlauf der Erkrankung sowohl in den CD30+ großzelligen Lymphomen der Haut (Patient III) als auch in der lymphomatoiden Papulose (Patient III).
Eine weitere Möglichkeit wäre die regelmäßige Entstehung klonaler T-Zellen, welche sich jedoch nur bei Erwerb weiterer genetischer Aberrationen, z.B. Mutationen oder chromosomale Imbalanzen, zu Tumoren entwickeln. Solange diese klonalen Zellen noch der Apoptose unterliegen, treten keine klinisch relevanten Zweit-Lymphome auf. Für diese Variante spricht auch der Nachweis von verschiedenen Klonen in zeitlich bzw. räumlich verschiedenen Läsionen der lymphomatoiden Papulose.

7. Verteilung klonaler und polyklonaler T-Zellen im Infiltrat verschiedener Stadien der Mykosis fungoides (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000)

7.1. Hintergründe und Fragestellungen

Es ist bekannt, daß sowohl Tumorzellen als auch reaktive Zellen sich im Infiltrat befinden. Bisher wurden verschiedene Untersuchungen vorgenommen, um die Lokalisation der Tumorzellen festzustellen und ihre Interaktion mit anderen Zellen, z.B. Keratinozyten zu messen (Smoller, Am J Surg Pathol, 1995; Hansen ER, Arch Dermatol, 1996). Dabei wurden verschiedene Techniken, wie z.B. die Licht- und Elektronenmikroskopie und die Immunhistochemie angewendet (Nickoloff BJ, Am J Dermatopathol, 1988; Ralfkiaer E, Br J Dermatol, 1991; Smoller, Am J Surg Pathol, 1995). Die Anwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die α- bzw. β-Kette der T-Zell-Rezeptoren zeigte, daß in einigen Hautproben von MF-Patienten eine bevorzugte Expression einer V-Familie gefunden werden kann. Diese Färbung markiert die expremierte V-Familie, jedoch nicht den T-Zell-Klon selbst (Bagot M, J Am Acad Dermatol, 1992; Potoczna N, J Cutan Pathol, 1996). Mit Hilfe der im Abschnitt 4 erläuterten Methoden der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden verschiedene Stadien der Mykosis fungoides analysiert, um folgende Fragestellungen zu beantworten:

- In welchen anatomischen Strukturen (Epidermis, Dermis) sind die Tumorzellen der Mykosis fungoides in verschiedenen Stadien der Erkrankung lokalisiert?
- Inwieweit korreliert die Vβ-Färbung mit der Darstellung der Tumorzellen im Infiltrat?

7.2. Patienten, spezielle methodische Aspekte, Ergebnisse

Insgesamt wurden 5 Patienten mit Mykosis fungoides untersucht (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000).
Patient I war zum Untersuchungszeitpunkt 56 Jahre alt und wies ein Rezidiv der Mykosis fungoides im Ekzemstadium mit ausschließlicher Hautmanifestation des T-Zell-Lymphoms auf.

Bei **Patient II** handelte es sich um eine 68-jährige Patientin mit einem Rezidiv der Mykosis fungoides, welche klinisch als Ekzem dominierte ohne interne Beteiligung.

Die untersuchten Hautproben der Patienten I und II wurden vom Unterschenkel entnommen. Histologisch waren im dermalen bandförmigen Infiltrat wenige mittelgroßzellige pleomorphe T-Zellen mit cerebriformen Kernen und überwiegend reaktive Lymphozyten zu sehen. Nur vereinzelt stiegen T-Lymphozyten in die Epidermis auf. Mittels Mikromanipulation wurden einzelne CD4+ Lymphozyten aus der Dermis isoliert.

Patient III war 66 Jahre alt. Er stellte sich mit einem Rezidiv der Mykosis fungoides im Plaquestadium vor. Histologisch zeigte sich in einer Probe der Übergang vom Ekzem- zum Plaquestadium (IIIa) und in einer zweiten Probe ein typisches Plaquestadium (IIIb). Es imponierte eine Hyperkeratose und Akanthose der Epidermis, dermal ein ausgeprägtes lymphohistiozytäres Infiltrat mit mitelgroßzelligen pleomorphen Lymphozyten, Eosinophilen und Plasmazellen. (IIIa, IIIb) Zusätzlich waren in der Probe IIIb noch tiefliegende kleine Gruppen atypischer T-Lymphozyten (Tumorzellnester) zu sehen. Eine bevorzugte Expression der Vβ3-Familie konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Von beiden Proben wurden CD4+ und Vβ3+ Lymphozyten aus dem bandförmigen dermalen Infiltrat, den tiefliegenden dermalen Tumorzell-Nestern sowie aus der Epidermis isoliert zur Analyse mittels Einzelzell-PCR für das TCR-γ Gen.

Patient IV war ein 55 jähriger Mann mit einem Rezidiv der Mykosis fungoides im Plaquestadium ohne Nachweis einer internen Beteiligung durch das Lymphom. Histologisch war der gleiche Befund wie in Probe IIIa zu erheben. Bei diesem Patienten war die Vβ5.1-Familie bevorzugt exprimiert. Es erfolgte die Isolation von Vβ5.1+ Lymphozyten für die Einzelzell-PCR.

Bei dem **Patienten V** handelte es sich um einen 60 Jahre alten Mann mit einer Mykosis fungoides im Tumorstadium, ohne daß eine extrakutane Beteiligung durch das T-Zell-Lymphom festgestellt werden konnte. Die untersuchte Hautprobe zeigte ein ausgeprägtes dermales Infiltrat mit mehrheitlich mittel- bis großzelligen atypischen Lymphozyten mit cerebriformen Kernen und nur wenigen reaktiven Lymphozyten. Eine dominierende Vβ22-Expression konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Vβ22+ Zellen wurden zur Durchführung einer Einzelzell-PCR isoliert.

Bei allen 5 Patienten konnte in der Routine-PCR-Untersuchung ein monoklonales Amplifikat für das TCR -γ- Gen aus der Gesamt-DNA von Blut und Haut nachgewiesen werden.

Die Isolierung der Zellen mittels Mikromanipulation und anschließende Amplifikation für die TCR-γ- und das TCR-β-Gene (3, 5.1, 22) analog zu den immunhistochemischen Charakteristika erfolgte wie im Abschnitt 4 beschrieben.

Insgesamt wurden 387 Einzelzellen isoliert, davon 180 aus der Epidermis und 207 aus der Dermis. TCR-γ Sequenzen wurden von 181 Zellen gewonnen (79 epidermotrope, 102 dermale Zellen)

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV: Patienten, Stadien, Färbung und Ergebnisse der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR-Analyse (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000)

Patienten	Kompartment	Färbung	Stadium	isolierte Zellen	negative Kontrollen	polyklonale/gesamt - Sequenzen	klonale/gesamt-Sequenzen
I	Dermis*	CD4	Initiales Ekzem	63	7	22/22	0/22
II	Dermis*	CD4	Initiales Ekzem	36	4	12/12	0/12
IIIa	Dermis	CD4	Ekzem bis Plaque	18	2	9/9	0/9
IIIa	Epidermis	CD4	Ekzem bis Plaque	36	4	1/10	9/10
IIIb	Epidermis	Vβ3	Plaque	36	4	1/25	24/25
IIIb	Epidermis	CD4	Plaque	36	4	3/13	10/13
IIIb	Dermis	Vβ3	Plaque	27	3	4/13	9/13
IIIb	Tiefe Dermis, Gruppen atypischer Zellen	CD4	Plaque	27	3	5/20	15/20
IV	Epidermis	Vβ5.1	Plaque	72	8	11/31	21/31
V	Dermis*	Vβ22	Tumor	36	4	6/26	20/26

*Es konnten keine T-Zellen aus der Epidermis isoliert werden, wegen des zu geringen Infiltrates.

Die epidermotropen Zellen (Proben IIIa: 21/32 , IIIb: 9/10 und IV: 33/38 klonal) gehören überwiegend zu den Tumorzellen.

In den Proben I und II (initiales Ekzemstadium) konnten mikroskopisch keine epidermotropen Tumorzellen nachgewiesen werden. Das traf auch für Probe V (MF Tumorstadium) zu, wobei hier jedoch atypische Zellen in der Dermis dominierten.

Bei den dermalen Zellen steigt der Anteil der Tumorzellen im Infiltrat in Korrelation zum Fortschreiten der Erkrankung. So konnten bei dem initialen Ekzemstadium im Rezidiv (Proben I und II) keine Tumorzellen mittels der angewendeten Methodik nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich im Plaquestadium zu ca. 1/3 um Tumorzellen, wobei einige der malignen Zellen in Gruppen angeordnet sind (Tumorzellnester). Diese Nester befinden sich in der tiefen Dermis fern vom bandartigen Infiltrat. Im Tumorstadium gehört die überwiegende Menge der T-Lymphozyten im Infiltrat zu den Tumorzellen (Probe V: 20/26 klonal).

Nebenbefundlich ist bei den Patienten I und III ein bialleles Rearrangement für das TCR-γ-Gen des Tumorklons gefunden worden.

7.3. Diskussion

Die Methode der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR kann exakte Angaben zu individuellen Genkonstellationen einer einzelnen Zelle geben. Diese Methode wurde für die Anwendung am histologischen Schnitt etabliert (Kuppers R, Mol Med Today, 1995). Seitdem wurden vor allem lymphoproliferative Erkankungen mit dieser Methodik untersucht, z.B. der Morbus Hodgkin (Kuppers R, Mol Med Today, 1995, Stein H, Cancer Surv, 1997), das großzellige anaplastische T-Zell-Lymphom (Lorenzen et al, 1996) und primär kutane B-Zell Lymphome (Gellrich S, J Invest Dermatol, 1997; Gellrich S, J Invest Dermatol, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation von Tumorzellen in der Haut in verschiedenen Stadien der Mykosis fungoides zu untersuchen. Der Vorteil der Mikromanipulation besteht darin, daß die genaue Lokalisation der Tumorzelle anhand ihrer T-Zell-Rezeptor-Klonalität nachgewiesen werden kann. Alle anderen Verfahren können entweder die Klonalität vieler Zellen feststellen oder phänotypische Merkmale im histologischen Schnitt darstellen. (Kuppers R, Mol Med Today. 1995)

Technisch gesehen konnte erstmalig mit dieser Arbeit gezeigt werden, daß es sich beim Vorhandensein von 2 dominierenden PCR-Produkten in der DNA aus läsionaler Haut nicht um 2 Tumorzell-Linien handelt, sondern um ein bialleles Rearrangement innerhalb einer Tumorzelle.

Es ist bekannt, daß die Tumorzellen der MF in verschiedenen Geweben des Körpers vorkommen und zwischen Haut, Lymphknoten und Blut rezirkulieren (Muche JM, Blood, 1997). Bisher wurde die Verteilung von Tumorzellen der MF in der Haut durch phänotypische Merkmale beurteilt. Dazu wurden die Gewebeschnitte histologisch mit den Vβ-Familien angefärbt. In einem Teil der MF-Fälle wird eine Vβ-Familie bevorzugt exprimiert, was mit dem Auftreten von Tumorzellen im Infiltrat korreliert (Bagot M, J Am Acad Dermatol, 1992; Potoczna N, J Cutan Pathol, 1996; Preesman AH, J Invest Dermatol, 1992; Fivenson DP, J Am Acad Dermatol, 1994). Diese Daten können zwar eine Orientierung für die Lokalisation der Tumorzellen geben, jedoch hinsichtlich der einzelnen Zelle sind sie nicht repräsentativ. Werden die Anteile der Vβx+ klonalen Zellen mit den Anteilen der CD4+ Zellen verglichen (Probe IIIb) zeigt sich, daß weder die CD4+ noch die Vβx+ Zellen eine homologe Zell-Population darstellen.

Über die Ursachen für die Verteilung der MF-Tumorzellen und der reaktiven Zellen kann diskutiert werden, daß 1. Zytokinmuster oder Adhäsionsmoleküle im Infiltrat eine Rolle spielen (Asadullah K, Exp Dermatol, 1998), 2. daß die Tumorzellen gemeinsam mit den reaktiven Zellen auf ein unbekanntes Antigen reagieren und deshalb in die Haut gelangen, oder 3. daß es sich im Falle der epidermotropen Zellen um einen Tumorescape-Mechanismus handelt. Dabei entziehen sich die Tumorzellen durch Lokalisation in der Epidermis oder innerhalb der Tumorzellnester in der tiefen Dermis den Einflüssen der reaktiven Zellen im bandartigen Infiltrat. Daß reaktive CD8+ Zellen autologe Tumorzellen zerstören können, zeigte Bagot et al. Die Arbeitsgruppe wies außerdem nach, daß Patienten mit vielen CD8+ Zellen im Infiltrat eine gute Prognose dieser Erkrankung haben (Bagot M, Ann N Y Acad Sci, 2001; Hoppe RT, J Am Acad Dermatol, 1995).

Möglicherweise hat das bandförmige Infiltrat im initialen Stadium der Mykosis fungoides eine Barrierefunktion, wobei die Tumorzellen bereits vor Eindringen in die Epidermis durch das Immunsystem beseitigt werden. Mit dem Fortschreiten der Erkankung können dann einige Tumorzellen doch in die Epidermis eindringen. Dabei kommt ihnen die Expression des CLA zugute, welches den reaktiven Lymphozyten fehlt (Borowitz MJ, Leukemia, 1993).

Mit diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, in welchen quantitativen Verhältnissen Tumorzellen der MF in Epidermis und Dermis in verschiedenen Stadien vorhanden sind (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000).

8. Zusammenfassende Betrachtung der Daten und Perspektiven

Primär kutane Lymphome sind typische Krankheitsbilder in der Dermatologie. Obwohl diese Erkrankungen zu den seltenen Krankheiten zählen, sind sie jedoch von therapeutischem und wissenschaftlichen Interesse.
Im Mittelpunkt der experimentellen Arbeiten standen die Methode der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR, welche zur Erforschung verschiedener Lymphomentitäten eingesetzt wurde.

Klassifikation

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Klassifikation und Therapie primär kutaner Lymphome. Zunächst wird die 1997 veröffentlichte **EORTC-Klassifikation** mit ihren wichtigsten Entitäten erläutert. Die EORTC-Klassifikation geht auf spezifische Besonderheiten der primär kutanen Lymphome ein und orientiert sich an der guten Prognose dieser Erkrankungen. Parallel wird die WHO-Klassifikation bei der Arbeit mit primär kutanen Lymphomen verwendet.

Zu den häufigsten **primär kutanen B-Zell-Lymphomen** gehören die Keimzentrumszell-Lymphome und die Marginalzonenlymphome, welche überwiegend an Kopf und Stamm lokalisiert sind und eine 5-Jahresüberlebenszeit von 97% aufweisen. Seltener sind die großzelligen B-Zell-Lymphome, welche sich überwiegend an den unteren Extremitäten manifestieren und eine 5-Jahresüberlebenszeit von 57% haben.

80% der primär kutanen Lymphome gehören zu den **T-Zell-Lymphomen**. Dabei stellt die Mykosis fungoides mit ihren klinischen Stadien Ekzem, Plaque und Tumor die dominierende Entität dar. Weiterhin werden die lymphomatoide Papulose und das CD30+ großzellige Lymphom erläutert.
In einer ersten Arbeit wurden atypische T-Zellen von Hautproben verschiedener Stadien der Mykosis fungoides entnommen und hinsichtlich ihrer T-Zell-Klonalität untersucht. Ein klonal rearrangiertes T-Zell-Rezeptorgen gilt als ein wesentliches molekulargenetisches Merkmal von T-Zell-Lymphomen, kann jedoch auch in entzündlichen Erkrankungen gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, daß im initialen Ekzemstadium nur wenige klonale maligne T-Zellen in der Probe nachzuweisen sind. Mit Zunahme des Infiltrates (Plaque) sind die malignen Zellen in der Epidermis oder gruppiert in der Dermis lokalisiert. Im Tumorstadium dominieren die malignen Zellen das dermale Infiltrat (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2000).

Therapie- und Verlaufskontrolle

Die Therapie und Verlaufskontrolle **primär kutaner T-Zell-Lymphome** richtet sich nach der Prognose und dem Stadium der Erkrankung und erfolgt in 4 bis 12 wöchigen Abständen. In den letzten 10 Jahren haben sich neue Medikamente, immunmodulatorische Substanzen, bei der Therapie primär kutaner T-Zell-Lymphome durchgesetzt wie z.B. das Interferon α. Andere. werden in Studien für verschiedene Krankheitsstadien erprobt wie z.B. das IL-2-Diphtherie-Fusionsprotein. Dabei werden natürlich vorhandene Abwehrmechanismen gentechnisch modifiziert und verstärkt. Eine neuere Variante der Therapie stellen sogenannte Mimotop-Vakzinierungen da. Dafür wurden Nonapeptide über Peptidbibliotheken identifiziert, welche spezifisch die T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen bei

Patienten mit primär kutanen Lymphomen aktivieren (Linnemann T, Ann Onc 2000; Linnemann T, Eur J Immunol). Interessanterweise handelt es sich hierbei nicht ausschließlich um die Aktivierung vorhandener Anti-Tumor-T-Zellen, sondern auch um die Aktivierung weiterer T-Zell-Populationen, welche die künstlichen Peptide und damit den Tumor erkennen. In individuellen Heilversuchen konnte die Wirksamkeit dieses Therapieverfahrens gezeigt werden (Sherev T et Gellrich S, eingereicht in J Immunol).
Ein weiteres Beispiel für modulierte Immuntherapeutika, welches in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden ist, stellt die Transfektion eines Konstruktes (anti-CD30-scFv-g-Rezeptor) in autologe zytotoxische T-Zellen eines Patienten mit CD30+ großzelligem T-Zell-Lymphom dar. Diese modifizierten T-Zellen binden mittels Antikörperfragment gegen das CD30-Molekül an die CD30+ Tumorzellen. Mit dem anderen Teil des transfizierten Proteins wird die T-Zelle aktiviert und kann ein Abtöten der Tumorzelle in vitro bewirken (Hombach A, Gene Ther, 2001).

Therapeutisch werden aufgrund der lokalen Erscheinung der **primär kutanen B-Zell-Lymphome** die Exzision und Bestrahlung mit Röntgenweichstrahlung oder schnellen Elektronen angewendet. Ist dieses Vorgehen wegen eines großflächigen Befalls oder wegen sekundär interner Manifestation nicht möglich, kann eine Chemotherapie durchgeführt werden. Moderne immuntherapeutische Medikamente halten zunehmend Einzug in die Behandlung primär kutaner B-Zell-Lymphome. In dieser Arbeit werden unsere Erfahrungen mit dem therapeutischen anti-CD20-Antikörper (Rituximab) vorgestellt (Gellrich S, Hautarzt, 2001). Bisher sind 11 Patienten behandelt worden. Das Dosierungsschema umfasste 8 Zyklen in einer Dosierung von 375mg/m^2 Körperoberfläche. 9/11 Patienten haben auf die Therapie angesprochen: 7/11 Patienten hatten nach Therapieende keine sichtbaren Hautveränderungen, 2/11Patienten eine deutlich geringere Tumorinfiltrationen und 2/11 Patienten eine Progression. Bei 2 Patienten wurde die Therapie wegen Progression abgebrochen. Bei 7 Patienten erfolgte eine posttherapeutische histologische Kontrolle der betroffenen Areale, wobei in 3 Biopsien keine Infiltrate und in 2 Präparaten fraglich Tumorzellen nachweisbar waren. Die Nachbeobachtung bis Dezember 2002 zeigt rezidivfreie Intervalle zwischen 1 und 24 Monaten, wobei 4 von 9 Patienten zum jetzigen Zeitpunkt ein Rezidiv hatten.

Ätiopathogenese

Die Ätiopathogenese primär kutaner Lymphome ist ungeklärt und dürfte für verschiedene Entitäten unterschiedlich sein.
Bei den kutanen **B-Zell-Lymphomen** konnte die Assoziation dieser Erkrankungen mit Infektionen durch Borrelia burgdorferi gezeigt werden, ähnlich dem Zusammenhang zwischen MALT-Lymphomen des Magens bei Helicobacter pylori- Besiedlung. Wie heute bekannt ist, werden bei chronischen Entzündungsreizen häufiger Transformationsereignisse in Lymphozyten wirksam, welche zur Umwandlung in Tumorzellen führen können. Im Rahmen der Etablierung von Primersystemen zur Amplifikation von Immunglobulingenen konnte die klonale B-Zell-Proliferation in Patienten mit Sjögren-Syndrom, einer chronisch entzündlichen Autoimmunerkrankung, nachgewiesen werden (Gellrich S, Arthritis Rheum, 1999). Es ist bekannt, daß Patienten mit Sjögren-Syndrom häufiger B-Zell-Lymphome entwickeln.

Die Charakterisierung von Immunglobulingenen kann Anhaltspunkte über den Entwicklungsstand von B-Zellen geben: Naive B-Zellen sind nicht mutiert, B-Zellen im Keimzentrum befinden sich im Prozeß der Mutation und reife B-Zellen haben den Prozeß der Mutationen bereits abgeschlossen. In Anlehnung an das physiologische Modell wurden Tumore der B-Zellen entsprechend ihres Mutationsstatus in Prä-Keimzentrumszelllymphome, Keimzentrumszell-Lymphome und Postkeimzentrumszell-Lymphome eingeordnet, Die Fragestellung unserer Arbeiten bezog darauf, inwieweit sich primär kutane B-Zell-Lymphome (histologisch Keimzentrumszell-Lymphome und großzellige B-Zell-Lymphome) in dieses Schema des Mutationsstatus einordnen lassen. Dazu wurden einzelne B-Zellen aus dem histologischen Schnitt mit Hilfe der hydraulischen Mikromanipulation isoliert und anschließend mit Hilfe der Einzelzell-PCR die leichte und die schwere Kette des Immunglobulingens amplifiziert und sequenziert. So konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen primär kutaner B-Zell-Lymphome einen dem Keimzentrum ähnlichen Mutationsstatus, nämlich somatische Mutationen und intraklonale Diversifikation, aufweisen (Gellrich S, J Invest Dermatol, 1997; Gellrich S, J Invest Dermatol, 2001). Die Daten sprechen für einen noch aktiven Mutationsmechanismus, sogenannte ongoing mutations (Golembowski S, Immunobiology, 2000). Dieser noch aktive Mutationsmechanismus gilt offensichtlich für weitere Gene und ist ein Charakteristikum von B-Zell-Lymphomen (Pascuallucci L, Nature, 2001).

Die **Mykosis fungoides** ist die häufigste Entität primär kutaner T-Zell-Lymphohme. Mit Hilfe der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR für T-Zell-Rezeptor-γ konnte die Verteilung der Tumorzellen in verschiedenen Stadien dieser Erkrankung gezeigt werden.
Initiale Läsionen enthalten nur vereinzelt Tumorzellen, obwohl diese Population im peripheren Blut und den Lymphknoten zirkuliert.
Mit Entstehung von Plaqueläsionen nimmt der Epidermotropismus der Tumorzellen zu. In dem subepidermalen bandförmigen lymphozytären Infiltrat befinden sich nur wenige klonale Zellen. Die Tumorzellen sind vielmehr unterhalb dieses Infiltrates lokalisiert. Sie liegen in Gruppen und sind vom reaktiven Infiltrat räumlich getrennt.
Im Tumorstadium überwiegen die malignen Zellen in der Dermis. Ihr Epidermotropismus ist dann gering. Die Daten lassen vermuten, daß eine effektive Tumorabwehr bei Patienten mit Mykosis fungoides existiert, da sich das Infiltrat langsam und zunächst als Ekzemform ausbreitet. Klinisch kann zu Zeiten eines Ekzemstadiums eine Regredienz der Hautveränderungen unter Einfluß von UV-Licht beobachtet werden. Im Plaque- und Tumorstadium dagegen breitet sich die Erkrankung schneller aus. Vermutlich lässt die Effektivität der natürlichen Tumorabwehr bei erhöhter Last an malignen Zellen in der Haut nach (Gellrich, J Invest Dermatol, 2000).

Eine weitere Unterform der kutanen Lymphome stellen die **primär kutanen CD30+ T-Zell Lymphome** dar. Erstmalig beschrieben wurde das CD30 Molekül auf den Hodgkin-Zellen, später auf Zellen anderen Tumoren wie dem großzelligen anaplastischen Lymphom und einigen kutanen Lymphomen. Physiologischerweise ist dieses Molekül u.a. in die Regulation der Apoptose und die Elimination von Autoimmunerkrankungen eingebunden. Genetische Veränderungen wie z.B. Translokationen und Mutationen im Gen des CD30-Moleküls können zur Störung der physiologischen Regulation und damit

zur Tumorentstehung führen. Das bei den nodalen CD30+ großzelligen anaplastischen Lymphomen durch Translokation entstandene NPM-ALK Fusionsprotein spielt bei den primär kutanen CD30+ Lymphomen eine untergeordnete Rolle. Das EBV-Genom ist häufig mit CD30+ Zellen assoziiert. Darum wird vermutet, daß es eine pathogenetische Rolle in Lymphomen spielen kann.
In Untersuchungen mittels Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wurden CD30+ Zellen aus primär kutanen CD30+ großzelligen Lymphomen hinsichtlich ihrer T-Zell-Klonalität untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß nicht alle atypischen Zellen zur Tumorpopulation gehören. Es wird vermutet, daß ein unbekannter Stimulus zur Ausprägung der Zellmorphe und zur Expression des CD30-Moleküls führt (Gellrich S, J Invest Dermatol, 2003).

Eine weitere Entität, bei welcher CD30+ Zellen eine Rolle spielen, ist die **lymphomatoide Papulose**. Diese Erkankung ist insoweit besonders interessant, da es sich um eine gutartige Erkrankung mit den Merkmalen einer Tumorerkrankung handelt. Betroffene Patienten zeigen rasch aufschießende Papeln und Knoten, welche spontan regredient sind und unter Hinterlassung hyperpigmentierter Narben abheilen. Die lymphomatoide Papulose hat eine ausgezeichnete Prognose, trotzdem wird sie als niedrig malignes T-Zell-Lymphom der Haut klassifiziert. Die Ursachen dafür sind einerseits die histologischen Merkmale, wobei große atypische CD30+ Lymphozyten in den Läsionen dominieren, und andererseits die Assoziation dieser Erkrankung mit der Entwicklung von Hodgkin-Lymphomen und großzelligen anaplastischen CD30+ Lymphomen besteht. Die assoziierten Lymphome sind bestimmend für die Prognose dieser Patienten.
In den hier dargestellten Untersuchungen wurden CD30+ große atypische Zellen einzeln isoliert und anschließend mittels PCR für die Gene des T-Zell-Rezeptor-γ und des Immunglobulinrezeptors amplifiziert. In zwei von drei Fällen waren diese CD30+ Zellen polyklonal. Die aus der Fragmentanalyse bekannte klonale T-Zell-Population konnte dagegen in CD3+CD30- kleinen Zellen gefunden werden. In einem dritten Fall enthielten die CD30+ Zellen klonale B-Zellen, welche die gleichen Immunglobulingene rearrangiert hatten wie Zellen aus einem zuvor bestehenden Hodgkin-Lymphom desselben Patienten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es für das Aufschießen und die Regredienz der Läsionen der lymphomatoiden Papulose einen Stimulus gibt und die klonalen T- und B-Zellen als Begleitinfiltrat ohne pathologische Bedeutung anzusehen sind. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Untersuchung von Steinhoff et al, Blood, 2002, welcher bei Untersuchung von 12 Fällen in nahezu allen CD30+ Zellen klonale Populationen nachgewiesen hat (submitted Gellrich et al in J Invest Dermatol). Die kontroverse Aussage dieser Daten sollte an Studien mit größeren Fallzahlen untersucht werden.

Perspektivisch wird sich die wissenschaftliche Arbeit weiter auf die Ätiopathogenese und Charakterisierung primär kutaner B-Zell-Lymphome und CD30+ Lymphome konzentrieren. In Anlehnung an die Experimente von Alizadeh et al. werden hier cDNA-Array-Experimente bei der Beantwortung der Fragen zum Verlauf und dem Therapieansprechen von primär kutanen Lymphomen helfen (Alizadeh AA, Nature, 2000).
Die Methodik der Mikromanipulation und Einzelzell-PCR wird weiter zur Verfügung stehen, wobei sich die wissenschaftlichen Fragestellungen nicht nur auf die Analyse von primär kutanen Lymphomen

beziehen, sondern auch auf andere Themen, z.B. die Karzinogenese von Spinaliomen oder lymphozytäre Infiltrate in entzündlichen Erkrankungen.
Insgesamt bilden die Daten dieser Arbeit eine Grundlage für eine Fortsetzung der Untersuchung zur Ätiopathogenese von primär kutanen Lymphomen und deren Therapie und bieten die Möglichkeiten vielfältiger wissenschaftlicher Kooperationen.

9. Literatur

Aarts WM, Willemze R, Bende RJ, Meijer CJ, Pals ST, van Noesel CJ. VH gene analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: evidence for ongoing somatic hypermutation and isotype switching. Blood. 1998 Nov 15;92(10):3857-3864

Aboulafia DM. Primary cutaneous large B-cell lymphoma of the legs: a distinct clinical pathologic entity treated with CD20 monoclonal antibody (rituximab). Am J Clin Oncol. 2001 Jun;24(3):237-240

Ahnhudt C, Muche JM, Dijkstal K, Sterry W, Lukowsky A. An approach to the sensitivity of temperature-gradient gel electrophoresis in the detection of clonally expanded T-cells in cutaneous T-cell lymphoma. Electrophoresis. 2001 Jan;22(1):33-38

Akhtar S, Maghfoor I. Rituximab plus CHOP for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002 Jun 6;346(23):1830-1831

Alibert JLM:Tableau du plan fonoide: Description des maladies de la peau, observée traitment. Barriois l'Aîné et Fils, Paris, 1806

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Staudt LM, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000 Feb 3;403(6769):503-511

Allen D, Simon T, Sablitzky F, Rajewsky K, Cumano A. Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response. EMBO J. 1988 Jul;7(7):1995-2001

Asadullah K, Docke WD, Volk HD, Sterry W. Cytokines and cutaneous T-cell lymphomas. Exp Dermatol. 1998 Dec;7(6):314-320

Asadullah K, Friedrich M, Docke WD, Jahn S, Volk HD, Sterry W. Enhanced expression of T-cell activation and natural killer cell antigens indicates systemic anti-tumor response in early primary cutaneous T-cell lymphoma. J Invest Dermatol. 1997 May;108(5):743-747

Asadullah K, Gellrich S, Haeussler-Quade A, Friedrich M, Docke WD, Jahn S, Sterry W. Cytokine expression in primary cutaneous germinal center cell lymphomas. Exp Dermatol. 2000 Feb;9(1):71-76

Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. Ann Oncol. 1997 Oct;8(10):979-985

Bagot M, Martinvallet D, Echchakir H, Chabanette-Schirm F, Boumsell L, Bensussan A: Functional inhibitory receptors expressed by a cutaneous T cell lymphoma-specific cytolytic clonal T cell population. J Invest Dermatol 2000, 115: 994-999

Bagot M, Nikolova M, Schirm-Chabanette F, Wechsler J, Boumsell L, Bensussan A. Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;941:31-38

Bagot M, Wechsler J, Lescs MC, Revuz J, Farcet JP, Gaulard P. Intraepidermal localization of the clone in cutaneous T-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol. 1992 Oct;27(4):589-593

Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, Miller RA, Levy S, Levy R. Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. Blood. 1991 Sep 15;78(6):1561-1568

Bahler DW, Levy R. Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):6770-6774

Bahler DW, Swerdlow SH. Clonal salivary gland infiltrates associated with myoepithelial sialadenitis (Sjogren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansions. Blood. 1998 Mar 15;91(6):1864-1872

Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments.Exp Clin Immunogenet.1998;15:171-183

Basarab T, Fraser-Andrews E-A, Orchard G, Whittaker S, Russel-Jones R. Lymphomatoid papulosis in association with mycosis fungoides: a study of 15 cases. Br-J-Dermatol. 1998 139: 630-638

Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. Blood 2000, 95:3653-3661

Bekkenk MW, Vermeer MH, Geerts ML, Noordijk EM, Heule F, van Voorst Vader PC, van Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Treatment of multifocal primary cutaneous B-cell lymphoma: a clinical follow-up study of 29 patients. J Clin Oncol. 1999 Aug;17(8):2471-2478

Beljaards R-C, Kaudewitz P, Berti E et al. Primary cutaneous CD30-positive large cell lymphoma: definition of a new type of cutaneous lymphoma with a favorable prognosis. A European Multicenter Study of 47 patients. Cancer. 1993; 71: 2097-2104

Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. Cell. 1991 Dec 20;67(6):1121-1129

Berek C, Milstein C. The dynamic nature of the antibody repertoire. Immunol Rev. 1988 Oct;105:5-26

Beylot-Barry M, Groppi A, Vergier B, Pulford K, Merlio JP. Characterization of t(2;5) reciprocal transcripts and genomic breakpoints in CD30+ cutaneous lymphoproliferations. Blood 1998, 91:4668-4676

Beylot-Barry M, Vergier B, DeMascarel A, Beylot C, Merlio JP. p53 oncoprotein expression in cutaneous lymphoproliferations. Blood. 1997 Jul 1;90(1):354-371

Beylot-Barry M, Sibaud V, Thiebaut R, Vergier B, Beylot C, Delaunay M, Chene G, Dubus P, Merlio JP. Evidence that an identical T cell clone in skin and peripheral blood lymphocytes is an independent prognostic factor in primary cutaneous T cell lymphomas. J Invest Dermatol. 2001 Oct;117(4):920-926

Boehncke WH, Schulte-Rebbelmund H, Sterry W. Plasma cells in the dermal infiltrate of mycosis fungoides are of polyclonal origin. Acta Derm Venereol. 1989;69(2):166-9

Boni R, Xin H, Kamarashev J et al. Allelic deletion at 9p21-22 in primary cutaneous CD30(+) large cell lymphoma. J-Invest-Dermatol. 2000; 115: 1104-1107

Bonnekoh B, Schulz M, Franke I, Gollnick H. Complete remission of a primary cutaneous B-cell lymphoma of the lower leg by first-line monotherapy with the CD20-antibody rituximab. J Cancer Res Clin Oncol. 2002 Mar;128(3):161-166.

Borowitz MJ, Weidner A, Olsen EA, Picker LJ. Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. Leukemia. 1993 Jun;7(6):859-863

Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Aug 19;94(17):9337-9342

Brauninger A, Kuppers R, Spieker T, Siebert R, Strickler JG, Schlegelberger B, Rajewsky K, Hansmann ML. Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. Blood. 1999 Apr 15;93(8):2679-2687.

Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. J Immunol. 1995 Jul 1;155(1):190-202.

Brezinschek HP, J Immunol. 1995; Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med. 1994 Jul 1;180(1):329-339

Bruggemann M, Muller HJ, Burger C, Rajewsky K. Idiotypic selection of an antibody mutant with changed hapten binding specificity, resulting from a point mutation in position 50 of the heavy chain. EMBO J. 1986 Jul;5(7):1561-1566.

Bryant E, Ronan SG, Iossifides IA. Plasma cell myeloma in a patient with a cutaneous T-cell lymphoma. Cancer. 1982 Nov 15;50(10):2122-2125

Burg G, Braun-Falco O. Morphological and functional differentiation and classification of cutaneous lymphomas. Bull Cancer. 1977;64(2):225-240.

Cerroni L, Kerl H. Primary cutaneous follicle center cell lymphoma. Leuk Lymphoma. 2001 Sep-Oct;42(5):891-900

Cerroni L, Signoretti S, Hofler G, Annessi G, Putz B, Lackinger E, Metze D, Giannetti A, Kerl H. Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a recently described entity of low-grade malignant cutaneous B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 1997 Nov;21(11):1307-1315

Cerroni L, Zochling N, Putz B, Kerl H. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. J Cutan Pathol. 1997 Sep;24(8):457-461

Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. Immunol Today. 1994 Aug;15(8):367-373

Child FJ, Russell-Jones R, Woolford AJ, Calonje E, Whittaker SJ. Immunoglobulin heavy chain variable region family expression in primary cutaneous B-cell lymphomas. Br J Dermatol. 2001 Oct;145(4):680

Child FJ, Woolford AJ, Calonje E, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Molecular analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in the diagnosis of primary cutaneous B cell lymphoma. J Invest Dermatol. 2001 Oct;117(4):984-989.

Chott A, Vonderheid E-C, Olbricht S, Miao N-N, Balk S-P, Kadin M-E. The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. J-Invest-Dermatol. 1996; 106: 696-700

Christensen H-K, Thomsen K, Vejlsgaard G-L. Lymphomatoid papulosis: a follow-up study of 41 patients. Semin-Dermatol. 1994; 13: 197-201

Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, Riethman H, Carter NP, Buluwela L, Winter G, Rabbitts TH. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. Nat Genet. 1994 Jun;7(2):162-168

Cox JP, Tomlinson IM, Winter G. A directory of human germ-line V kappa segments reveals a strong bias in their usage.Eur J Immunol.1994;24:827-836

Cumberbatch M, Gould SI, Peters SW, Kimber I. MHC class II expression by Langerhans cells and lymph node dentritic cells: possible evidence for maturation of Langerhans cells following contact sensetivity. J Immunol. 1991, 74: 414-419

Dalloul A, Laroche L, Bagot M, Mossalayi MD, Fourcade C, Thacker DJ, Hogge DE, Merle-Beral H, Debre P, Schmitt C. Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. J Clin Invest. 1992 Sep;90(3):1054-1060.

Davis T-H, Morton C-C, Miller-Cassman R, Balk S-P, Kadin M-E:Hodgkin's disease, lymphomatoid papulosis, and cutaneous T-cell lymphoma derived from a common T-cell clone. N-Engl-J-Med. 1992; 326: 1115-1122

de Kan R, van 't Veer MB. Clinical features of CD30 (Ki-1) positive anaplastic large-cell lymphoma (ALCL). Review of the literature. Neth J Med. 1993 Dec;43(5-6):277-284. Review.

De Vita S, Boiocchi M, Ferraccioli G. B-cell lymphomagenesis and human autoimmune models. Adv Clin Path. 1997 Apr;1(2):103-114.

DeCoteau-JF; Butmarc-JR; Kinney-MC; Kadin-ME. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30⊕ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large-cell lymphoma of nodal origin [see comments] Blood. 1996 Apr 15; 87(8): 3437-3441

Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation of mycosis fungoides/Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. Blood. 1998 Aug 15;92(4):1150-1159

Dick HM, Mackie R. Distribution of HLA antigens in patients with mycosis fungoides. Dermatologica. 1977;155(5):275-282

Dorner T, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. J Immunol. 1997 Mar 15;158(6):2779-2789

Dorner T, Farner NL, Lipsky PE. Ig lambda and heavy chain gene usage in early untreated systemic lupus erythematosus suggests intensive B cell stimulation. J Immunol. 1999 Jul 15;163(2):1027-1036

Dorner T, Foster SJ, Brezinschek HP, Lipsky PE. Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of
Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. Leukemia. 1996 Jul;10(7):1190-1197

Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. Lancet Oncol. 2002 Feb;3(2):97-104. Review

Dummer R, Willers J, Kamarashev J, Urosevic M, Dobbeling U, Burg G. Pathogenesis of cutaneous lymphomas. Semin Cutan Med Surg. 2000 Jun;19(2):78-86

Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. Cell. 1992 Feb 7;68(3):421-427

Duvic M. Bexarotene and DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK) in treatment of cutaneous T-cell lymphomas: algorithms. Clin Lymphoma. 2000 Nov;1 Suppl 1:51-55

Edelson,-R-L:Photopheresis: a clinically relevant immunobiologic response modifier. Ann-N-Y-Acad-Sci. 1991 Dec 30; 636154-636164

Ehlich A, Kuppers R. Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single B cells. Curr Opin Immunol. 1995 Apr;7(2):281-284. Review

el-Azhary R-A, Gibson L-E, Kurtin P-J, Pittelkow M-R, Muller S-A. Lymphomatoid papulosis: a clinical and histopathologic review of 53 cases with leukocyte immunophenotyping, DNA flow cytometry, and T-cell receptor gene rearrangement studies. J-Am-Acad-Dermatol. 1994; 30: 210-218

Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, Martelli MF, Stein. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. Blood 1995, 85:1-14

Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, Verhoef G, Menestrina F, Todeschini G, Paulli M, Lazzarino M, Giardini R, Aiello A, Foss HD, Araujo I, Fizzotti M, Pelicci PG, Flenghi L, Martelli MF, SantucciA. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. Blood 1999, 93:2697-2706

Feeney AJ, Lugo G, Escuro G. Human cord blood kappa repertoire.J Immunol.1997;158:3761-3768

Fivenson DP, Hanson CA, Nickoloff BJ. Localization of clonal T cells to the epidermis in cutaneous T-cell lymphoma. J Am Acad Dermatol. 1994 Nov;31(5 Pt 1):717-723

Foote J, Winter G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol Biol. 1992 Mar 20;224(2):487-499

Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. J Clin Invest. 1997 Apr 1;99(7):1614-1627

Garatti SA, Roscetti E, Trecca D, Fracchiolla NS, Neri A, Berti E. bcl-1, bcl-2, p53, c-myc, and lyt-10 analysis in cutaneous lymphomas. Recent Results Cancer Res. 1995;139:249-261

Geelen FA, Vermeer MH, Meijer CJ, Van der Putte SC, Kerkhof E, Kluin PM, Willemze R. bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. J Clin Oncol. 1998 Jun;16(6):2080-2085

Gellrich S, Golembowski S, Audring H, Jahn S, Sterry W. Molecular analysis of the immunoglobulin VH gene rearrangement in a primary cutaneous immunoblastic B-cell lymphoma by micromanipulation and single-cell PCR. J Invest Dermatol. 1997 Oct;109(4):541-545

Gellrich S, Lukowsky A, Schilling T, Rutz S, Muche JM, Jahn S, Audring H, Sterry W. Microanatomical compartments of clonal and reactive T cells in mycosis fungoides: molecular demonstration by single cell polymerase chain reaction of T cell receptor gene rearrangements. J Invest Dermatol. 2000 Oct;115(4):620-624

Gellrich S, Muche JM, Audring H, Sterry W. [Cutaneous B-cell lymphoma] Hautarzt. 2000 May;51(5):363-73; quiz 373-375

Gellrich S, Muche JM, Pelzer K, Audring H, Sterry W. [Anti-CD20 antibodies in primary cutaneous B-cell lymphoma. Initial results in dermatologic patients] Hautarzt. 2001 Mar;52(3):205-210

Gellrich S, Rutz S, Borkowski A, Golembowski S, Gromnica-Ihle E, Sterry W, Jahn S. Analysis of V(H)-D-J(H) gene transcripts in B cells infiltrating the salivary glands and lymph node tissues of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 1999 Feb;42(2):240-247

Gellrich S, Rutz S, Golembowski S, Jacobs C, von Zimmermann M, Lorenz P, Audring H, Muche M, Sterry W, Jahn S. Primary cutaneous follicle center cell lymphomas and large B cell lymphomas of the leg descend from germinal center cells. A single cell polymerase chain reaction analysis. J Invest Dermatol. 2001 Dec;117(6):1512-1520

Gellrich S, S.Rutz, S.Lippert, P.Lorenz, S. Golembowski, H. Audring, W.Sterry, S.Jahn. Studying Ig Genes in Single B Lymphocytes by Micromanipulation and Single Cell PCR. Biochemica, Boehringer Mannheim, 11/97

Gellrich S., J.Marcus Muche, Wolfram Sterry. Primär kutane Lymphome, Klinikarzt 2002, 31(5):114-121

Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, Rilke F, Stansfeld A, van Unnik J. Classification of non-Hodgkin lymphomas. Lancet 1974;2: 406-408

Golembowski S, Gellrich S, Lorenz P, Rutz S, Audring H, Sterry W, Jahn S. Mainly unmutated V(H) genes rearranged in B cells forming germinal centers in a cutaneous pleomorphic T-cell lymphoma. J Cutan Pathol. 1999 Jan;26(1):6-12

Golembowski S, Gellrich S, von Zimmermann M, Rutz S, Lippert S, Audring H, Lorenz P, Sterry W, Jahn S. Clonal evolution in a primary cutaneous follicle center B cell lymphoma revealed by single cell analysis in sequential biopsies. Immunobiology. 2000 Apr;201(5):631-644

Gordon-BG; Weisenburger-DD; Warkentin-PI; Anderson-J; Sanger-WG; Bast-M; Gnarra-D; Vose-JM; Bierman-PJ; Armitage-JO; et-al. Peripheral T-cell lymphoma in childhood and adolescence. A clinicopathologic study of 22 patients. Cancer. 1993 Jan 1; 71(1): 257-263

Grange F, Bagot M. [Prognosis of primary cutaneous lymphomas] Ann Dermatol Venereol. 2002 Jan;129(1 Pt 1):30-40

Gruss HJ, Duyster J, Herrmann F. Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease. Ann Oncol. 1996; 7:19-26

Guigou V, Cuisinier AM, Tonnelle C, Moinier D, Fougereau M, Fumoux F. Human immunoglobulin VH and VK repertoire revealed by in situ hybridization. Mol Immunol. 1990 Sep;27(9):935-940

Hansen ER. Immunoregulatory events in the skin of patients with cutaneous T-cell lymphoma. Arch Dermatol. 1996 May;132(5):554-561

Hardy K, Wright C, Rice S, Tachataki M, Roberts R, Morgan D, Spanos S, Taylor D. Future developments in assisted reproduction in humans. Reproduction. 2002 Feb;123(2):171-183

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994 Sep 1;84(5):1361-1392

Hawkins RE, Zhu D, Ovecka M, Winter G, Hamblin TJ, Long A, Stevenson FK. Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines. Blood. 1994 Jun 1;83(11):3279-3288

Heinzerling L, Dummer R, Kempf W, Schmid MH, Burg G. Intralesional therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in primary cutaneous B-cell lymphoma. Arch Dermatol. 2000 Mar;136(3):374-378

Heinzerling LM, Urbanek M, Funk JO, Peker S, Bleck O, Neuber K, Burg G, von Den Driesch P, Dummer R. Reduction of tumor burden and stabilization of disease by systemic therapy with anti-CD20 antibody (rituximab) in patients with primary cutaneous B-cell lymphoma. Cancer. 2000 Oct 15;89(8):1835-1844

Hentges F. B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. Clin Exp Immunol. 1994 Jul;97 Suppl 1:3-9

Herrmann JJ, Roenigk HH Jr, Hurria A, Kuzel TM, Samuelson E, Rademaker AW, Rosen ST. Treatment of mycosis fungoides with photochemotherapy (PUVA): long-term follow-up. J Am Acad Dermatol. 1995 Aug;33(2 Pt 1):234-242

Hillson JL, Karr NS, Oppliger IR, Mannik M, Sasso EH. The structural basis of germline-encoded VH3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A. J Exp Med. 1993 Jul 1;178(1):331-336

Hipp JD, Hipp JA, Lyday BW, Minev BR. Cancer vaccines: an update. In Vivo. 2000 Sep-Oct;14(5):571-85. Review

Hofbauer GF, Kessler B, Kempf W, Nestle FO, Burg G, Dummer R. Multilesional primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma responsive to antibiotic treatment. Dermatology. 2001;203(2):168-170

Holtl L, Rieser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H, Radmayr C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. J Urol. 1999 Mar;161(3):777-782

Hombach A, Muche JM, Gerken M, Gellrich S, Heuser C, Pohl C, Sterry W, Abken H. T cells engrafted with a recombinant anti-CD30 receptor target autologous CD30(+) cutaneous lymphoma cells. Gene Ther. 2001 Jun;8(11):891-895

Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. J Am Acad Dermatol. 1995 Mar;32(3):448-453

Hoppe,-R-T; Fuks,-Z; Bagshaw,-M-A. Radiation therapy in the management of cutaneous T-cell lymphomas. Cancer-Treat-Rep. 1979 Apr; 63(4): 625-632

Horie R, Watanabe T. CD30: expression and function in health and disease. Semin Immunol. 1998; 10:457-470,

Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. Blood. 1994 Jul 15;84(2):403-407

Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Dogan A, Spencer J. Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. Am J Pathol. 1993 Jan;142(1):285-292

Hussell T, Isaacson PG, Spencer J. Proliferation and differentiation of tumour cells from B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in vitro. J Pathol. 1993 Feb;169(2):221-227

Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer. 1983 Oct 15;52(8):1410-1416

Isaacson PG. Gastrointestinal lymphomas of T- and B-cell types. Mod Pathol. 1999 Feb;12(2):151-158

Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. Nature. 1991 Dec 5;354(6352):389-392.

Jaffe E-S, Harris N-L, Diebold J, Muller-Hermelink H-K. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. Am-J-Clin-Pathol. 1999 ; 111: 8-12

Jukes TH, King JL. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. Nature. 1979 Oct 18;281(5732):605-606

Kabat EA, Wu TT. Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann N Y Acad Sci. 1971 Dec 31;190:382-393

Kanavaros P, Ioannidou D, Tzardi M, Datseris G, Katsantonis J, Delidis G, Tosca A. Mycosis fungoides: expression of C-myc p62 p53, bcl-2 and PCNA proteins and absence of association with Epstein-Barr virus. Pathol Res Pract. 1994 Sep;190(8):767-774

Kempf W, Dummer R, Schmid MH, Fritz T, Wuthrich B, Burg G. Intralesional cisplatin for the treatment of cutaneous B-cell lymphoma. Arch Dermatol. 1998 Nov;134(11):1343-1345

Kersten B, Niemann B, Jahn S. Development of single-chain Fv fragments from a human anti-double-stranded DNA antibody to study the influence of somatic mutations on antigen binding. Exp Clin Immunogenet. 2001;18(2):96-99.

Klein U, Goossens T; Fischer M et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. Immunol-Rev. 1998; 162: 261-280

Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. Blood. 1997 Feb 15;89(4):1288-1298

Knaus PI, Lindemann D, DeCoteau JF, Perlman R, Yankelev H, Hille M, Kadin ME, Lodish HF. A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. Mol Cell Biol 1996, 16:3480-3489

Knobler,-R. Extracorporeal photochemotherapy-present and future. Vox-Sang. 2000; 78 Suppl 2197-2201

Kocks C, Rajewsky K. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. Annu Rev Immunol. 1989;7:537-559

Koeppel MC, Stoppa AM, Resbeut M, Blaise D, Coignet M, Coulier L, Maraninchi D, Sayag J. Mycosis fungoides and allogenic bone marrow transplantation. Acta Derm Venereol. 1994 Jul;74(4):331-332

Kuppers R, Hansmann ML, Diehl V, Rajewsky K. Molecular single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Mol Med Today. 1995 Apr;1(1):26-30

Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Micromanipulation and PCR analysis of single cell from tissue sections. In Weir DM, Blackwell C, Herzberg LA: Handbook of Experimental Immunology, 5th edn. Blackwell Scientific Publishers, Cambridge MA, 1995

Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. N Engl J Med. 1999 Nov 11;341(20):1520-1529

Kuppers R, Rajewsky K, Hansmann ML. Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. Eur J Immunol. 1997 Jun;27(6):1398-1405

Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91:10962-10966

Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J. 1993 Dec 15;12(13):4955-49567

Kuppers R. Hansmann ML, Rajewsky K. Micromanipulation and PCR analysis of single B-cells from tissue sections. In: Weir DM, Blackwell C, Herzberg LA (eds) Handbook of Experimental Immunology, Vol.4. Oxford, Blackwell Science, 1997, pp 206.1-206.4

Kutting B, Bonsmann G, Metze D, Luger TA, Cerroni L. Borrelia burgdorferi-associated primary cutaneous B cell lymphoma: complete clearing of skin lesions after antibiotic pulse therapy or intralesional injection of interferon alfa-2a. J Am Acad Dermatol. 1997 Feb;36(2 Pt 2):311-314

Kuzel TM, Roenigk HH Jr, Samuelson E, Herrmann JJ, Hurria A, Rademaker AW, Rosen ST. Effectiveness of interferon alfa-2a combined with phototherapy for mycosis fungoides and the Sezary syndrome. J Clin Oncol. 1995 Jan;13(1):257-263

Leenman-EE; Afanas'ev-BV; Pozharisskii-KM. [Role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of lymphogranulomatosis. Immunohistochemical and molecular-biological (hybridization in situ) research].Arkh-Patol. 1999 Jan-Feb; 61(1): 15-22

Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Muller W, Bontrop R, Lemaitre M, Malik A, Barbie V, Chaume D. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res.1999;27:209-212

Lefranc MP. Unique database numbering system for immunogenetic analysis.Immunol Today.1997;18:509

LeMaistre CF. DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): other potential applications. Clin Lymphoma. 2000 Nov;1 Suppl 1:37-40. Review.

Levi E, Wang Z, Petrogiannis-Haliotis T, Pfeifer WM, Kempf W, Drews R, Kadin ME: Distinct effects of CD30 and Fas signaling in cutaneous anaplastic lymphomas: a possible mechanism for disease progression. J Invest Dermatol 2000, 115:1034-1040

Li G, Chooback L, Wolfe JT, Rook AH, Felix CA, Lessin SR, Salhany KE. Overexpression of p53 protein in cutaneous T cell lymphoma: relationship to large cell transformation and disease progression. J Invest Dermatol. 1998 May;110(5):767-770

Li G, Salhany KE, Rook AH, Lessin SR: The pathogenesis of large cell transformation in cutaneous T-cell lymphoma is not associated with t(2;5)(p23;q35) chromosomal translocation. J Cutan Pathol 1997, 24:403-408

Lindhout E, Koopman G, Pals ST, de Groot C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal center reactions. Immunol Today. 1997 Dec;18(12):573-577

Linnemann T, Tumenjargal S, Gellrich S, Wiesmuller K, Kaltoft K, Sterry W, Walden P. Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. Eur J Immunol. 2001 Jan;31(1):156-165

Linnemann T, Wiesmuller KH, Gellrich S, Kaltoft K, Sterry W, Walden P. A T-cell epitope determined with random peptide libraries and combinatorial peptide chemistry stimulates T cells specific for cutaneous T-cell lymphoma. Ann Oncol 2000, 11:95-99

Lorincz AL. Cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) Lancet. 1996 Mar 30;347(9005):871-876

Lu D, Duvic M Medeiros L-J, Luthra R, Dorfman D-M, Jones D. The T-cell chemokine receptor CXCR3 is expressed highly in low-grade mycosis fungoides. Am-J-Clin-Pathol. 2001 ; 115: 413-421

Lukowsky A, Audring H, Heiduk U, Muche M, Richter S, Sterry W. [Detection of monoclonal T-cells with TCR gamma PCR in mycosis fungoides] Hautarzt. 1998 Aug;49(8):641-645

[No authors listed] National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. Cancer. 1982 May 15;49(10):2112-2135

Marks,-D-I; Rockman,-S-P; Oziemski,-M-A; Fox,-R-M. Mechanisms of lymphocytotoxicity induced by extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T cell lymphoma. J-Clin-Invest. 1990 Dec; 86(6): 2080-2085

Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P. Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade ymphoma. Eur J Immunol. 1999 Apr;29(4):1253-1264

Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, Matsumura R, Haino M, Fukita Y, Taka-ishi S, Imai T, Riley JH, Anand R, et al. Structure and physical map of 64 variable segments in the 3'0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Nat Genet. 1993 Jan;3(1):88-94

McCurley TL, Collins RD, Ball E, Collins RD. Nodal and extranodal lymphoproliferative disorders in Sjogren's syndrome: a clinical and immunopathologic study. Hum Pathol. 1990 May;21(5):482-492

McGregor JM, Crook T, Fraser-Andrews EA, Rozycka M, Crossland S, Brooks L, Whittaker SJ. Spectrum of p53 gene mutations suggests a possible role for ultraviolet radiation in the pathogenesis of advanced cutaneous lymphomas. J Invest Dermatol. 1999 Mar;112(3):317-321

Meijer CJ, Jiwa NM, Dukers DF, Oudejans JJ, de Bruin PC, Walboomers JM, van den Brule AJ. Epstein-Barr virus and human T-cell lymphomas. Semin Cancer Biol. 1996 Aug;7(4):191-196

Molina A, Nademanee A, Arber DA, Forman SJ. Remission of refractory Sezary syndrome after bone marrow transplantation from a matched unrelated donor. Biol Blood Marrow Transplant. 1999;5(6):400-404.

Mori M, Manuelli C, Pimpinelli N, Mavilia C, Maggi E, Santucci M, Bianchi B. CD30-CD30 ligand interaction in primary cutaneous CD30(+) T-cell lymphomas: A clue to the pathophysiology of clinical regression. Blood 1999, 94:3077-3083

Mortari F, Wang JY, Schroeder HW Jr. Human cord blood antibody repertoire. Mixed population of VH gene segments and CDR3 distribution in the expressed C alpha and C gamma repertoires. J Immunol. 1993 Feb 15;150(4):1348-1357

Mozzanica N, Cattaneo A, Fracchiolla N, Boneschi V, Berti E, Gronda E, Mangiavacchi M, Finzi AF, Neri A. Posttransplantation cutaneous B-cell lymphoma with monoclonal Epstein-Barr virus infection, responding to acyclovir and reduction in immunosuppression.J Heart Lung Transplant. 1997 Sep;16(9):964-968

Muche JM, Gellrich S, Sterry W: Treatment of Cutaneous T-cell lymphomas. Seminars Cutan. Med. Surg. 2000, 19: 142-148

Muche JM, Lukowsky A, Asadullah K, Gellrich S, Sterry W. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. Blood. 1997 Aug 15;90(4):1636-1642

Muche JM, Lukowsky A, Heim J, Friedrich M, Audring H, Sterry W. 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 Aug 15;94(4):1409-1417

Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML, Kuppers R. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. J-Exp Med 2000, 191:387-394

Nadali-G; Tavecchia-L; Zanolin-E; Bonfante-V; Viviani-S; Camerini-E; Musto-P; Di-Renzo-N; Carotenuto-M; Chilosi-M; Krampera-M; Pizzolo-G. Serum level of the soluble form of the CD30 molecule identifies patients with Hodgkin's disease at high risk of unfavorable outcome. Blood. 1998 Apr 15; 91(8): 3011-3016

Nagatani T, Miyazawa M, Matsuzaki T, Hayakawa H, Iemoto G, Kim ST, Baba N, Sugiyama A, Aihara M, Miyamoto H, et al. A case of cutaneous B-cell lymphoma treated successfully with MACOP-B. J Dermatol. 1993 Jan;20(1):40-44

Nickoloff BJ. Light-microscopic assessment of 100 patients with patch/plaque-stage mycosis fungoides. Am J Dermatopathol. 1988 Dec;10(6):469-477

Niedobitek-G: The role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. Ann-Oncol. 1996; 7 Suppl 4: 11-17

Oliven,-A; Shechter,-Y. Extracorporeal photopheresis: a review. Blood-Rev. 2001 Jun; 15(2): 103-108

Olsen,-E-A; Bunn,-P-A. Interferon in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Hematol-Oncol-Clin-North-Am. 1995 Oct; 9(5): 1089-1107

Pascual V, Capra JD. VH4-21, a human VH gene segment overrepresented in the autoimmune repertoire. Arthritis Rheum. 1992 Jan;35(1):11-18

Pascual V, Cha S, Gershwin ME, Capra JD, Leung PS. Nucleotide sequence analysis of natural and combinatorial anti-PDC-E2 antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. Recapitulating immune selection with molecular biology. J Immunol. 1994 Mar 1;152(5):2577-2585

Pascual V, Randen I, Thompson K, Sioud M, Forre O, Natvig J, Capra JD. The complete nucleotide sequences of the heavy chain variable regions of six monospecific rheumatoid factors derived from Epstein-Barr virus-transformed B cells isolated from the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Further evidence that some autoantibodies are unmutated copies of germ line genes. J Clin Invest. 1990 Oct;86(4):1320-1328

Pascual V, Verkruyse L, Casey ML, Capra JD. Analysis of Ig H chain gene segment utilization in human fetal liver. Revisiting the "proximal utilization hypothesis". J Immunol. 1993 Oct 15;151(8):4164-4172

Pascual V, Victor K, Lelsz D, Spellerberg MB, Hamblin TJ, Thompson KM, Randen I, Natvig J, Capra JD, Stevenson FK. Nucleotide sequence analysis of the V regions of two IgM cold agglutinins. Evidence that the VH4-21 gene segment is responsible for the major cross-reactive idiotype. J Immunol. 1991 Jun 15;146(12):4385-4391.

Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K, Dalla-Favera R. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 29;95(20):11816-11821

Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature. 2001 Jul 19;412(6844):341-346

Paul T, Radny P, Krober SM, Paul A, Blaheta HJ, Garbe C. Intralesional rituximab for cutaneous B-cell lymphoma. Br J Dermatol. 2001 Jun;144(6):1239-1243

Paulli M, Berti E, Boveri E et al. Cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: expression of bcl-2 and proteins of the tumor necrosis factor receptor superfamily. Hum-Pathol. 1998; 29: 1223-1230

Paulli M, Berti E, Rosso R, Boveri E, Kindl S, Klersy C, Lazzarino M, Borroni G, Menestrina F, Santucci M, et al. CD30/Ki-1-positive lymphoproliferative disorders of the skin—clinicopathologic correlation and statistical analysis of 86 cases: a multicentric study from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Cutaneous Lymphoma Project Group. J Clin Oncol. 1995 Jun;13(6):1343-1354

Peterfi T. Das mikrurgische Verfahren. Naturwissenschaften 1923, 11:81

Portlock CS. CHOP and rituximab in elderly patients. Curr Oncol Rep. 2002 Sep;4(5):414

Potoczna N, Boehncke WH, Nestle FO, Kuenzlen C, Sterry W, Burg G, Dummer R. T-cell receptor beta variable region (V beta) usage in cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) in comparison to normal and eczematous skin. J Cutan Pathol. 1996 Aug;23(4):298-305

Preesman AH, Hu HZ, Tilanus MG, de Geus B, Schuurman HJ, Reitsma R, van Wichen DF, van Vloten WA, de Weger RA. T-cell receptor V beta-family usage in primary cutaneous and primary nodal T-cell non-Hodgkin's lymphomas. J Invest Dermatol. 1992 Nov;99(5):587-593

Pulford K, Morris SW, Mason DY. Anaplastic lymphoma kinase proteins and malignancy. Curr Opin Hematol. 2001 Jul;8(4):231-6. Review

Qin Y, Greiner A, Trunk MJ, Schmausser B, Ott MM, Muller-Hermelink HK. Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. Blood. 1995 Nov 1;86(9):3528-3534

Rajewsky K, Kanzler H, Hansmann ML, Kuppers R. Normal and malignant B-cell development with special reference to Hodgkin's disease. Ann Oncol. 1997;8 Suppl 2:79-81. Review

Ralfkiaer E, Wollf-Sneedorff A, Vejlsgaard GL. Use of antibodies against the variable regions of the T-cell receptor alpha/beta heterodimer for the study of cutaneous T-cell lymphomas. Br J Dermatol. 1991 Nov;125(5):409-412

Rijlaarsdam JU, Toonstra J, Meijer OW, Noordijk EM, Willemze R. Treatment of primary cutaneous B-cell lymphomas of follicle center cell origin: a clinical follow-up study of 55 patients treated with radiotherapy or polychemotherapy. J Clin Oncol. 1996 Feb;14(2):549-555

Rogers M. Pityriasis lichenoides and lymphomatoid papulosis. Semin Dermatol. 1992 Mar;11(1):73-79. Review.

Roggero E, Zucca E, Mainetti C, Bertoni F, Valsangiacomo C, Pedrinis E, Borisch B, Piffaretti JC, Cavalli F, Isaacson PG. Eradication of Borrelia burgdorferi infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. Hum Pathol. 2000 Feb;31(2):263-268

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Sznol M, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Seipp CA, Einhorn JH, Rogers-Freezer L, White DE. Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1690-1695

Rosenquist R, Thunberg U, Li AH, Forestier E, Lonnerholm G, Lindh J, Sundstrom C, Sallstrom J, Holmberg D, Roos G. Clonal evolution as judged by immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in relapsing precursor-B acute lymphoblastic leukemia. Eur J Haematol. 1999 Sep;63(3):171-179

Rudiger T, Ott G, Ott MM, Muller-Deubert SM, Muller-Hermelink HK. Differential diagnosis between classic Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry. Am J Surg Pathol. 1998 Oct;22(10):1184-1191

Rudikoff S, Giusti AM, Cook WD, Scharff MD. Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Mar;79(6):1979-1983

Sabroe RA, Child FJ, Woolford AJ, Spittle MF, Russell-Jones R. Rituximab in cutaneous B-cell lymphoma: a report of two cases. Br J Dermatol. 2000 Jul;143(1):157-161

Sakai A, Marti GE, Caporaso N, Pittaluga S, Touchman JW, Fend F, Raffeld M. Analysis of expressed immunoglobulin heavy chain genes in familial B-CLL. Blood. 2000 Feb 15;95(4):1413-1419

Santana V, Rose NR. Neoplastic lymphoproliferation in autoimmune disease: an updated review. Clin Immunol Immunopathol. 1992 Jun;63(3):205-213

Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Frequent abnormalities of the p15 and p16 genes in mycosis fungoides and sezary syndrome. J Invest Dermatol. 2002 Mar;118(3):493-499

Schiemann WP, Pfeifer WM, Levi E, Kadin ME, Lodish HF. A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. Blood 1999, 15: 2854-2861

Schmoeckel C, Burg G, Braun-Falco O. Quantitative analysis of lymphoid cells in cutaneous low-grade malignant B-cell lymphomas. Arch Dermatol Res. 1979 Nov;266(3):239-251

Schutze K, Posl H, Lahr G. Laser micromanipulation systems as universal tools in cellular and molecular biology and in medicine. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1998 Jul;44(5):735-746

Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. Nature 1982, 299:65-67

Seo,-N; Tokura,-Y; Matsumoto,-K; Furukawa,-F; Takigawa,-M. Tumour-specific cytotoxic T lymphocyte activity in Th2-type Sezary syndrome: its enhancement by interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-12 and fluctuations in association with disease activity. Clin-Exp-Immunol. 1998 Jun; 112(3): 403-409

Shlomchik MJ, Aucoin AH, Pisetsky DS, Weigert MG. Structure and function of anti-DNA autoantibodies derived from a single autoimmune mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Dec;84(24):9150-9154.

Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. Am J Surg Pathol. 1995 Dec;19(12):1423-1430.

Smoller BR, Longacre TA, Warnke RA. Ki-1 (CD30) expression in differentiation of lymphomatoid papulosis from arthropod bite reactions. Mod Pathol. 1992 Sep;5(5):492-496

Soda R, Costanzo A, Cantonetti M, Orlandi A, Bianchi L, Chimenti S. Systemic therapy of primary cutaneous B-cell lymphoma, marginal zone type, with rituximab, a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody. Acta Derm Venereol. 2001 Jun-Jul;81(3):207-208

Stachowitz S, Mempel M, Schmockel C, von Spanyi R, Abeck D. Variable course of patients with plaque parapsoriasis [correction of psoriasis]: lack of transformation into tumorous mycosis fungoides. Blood. 2000 Jun 1;95(11):3635-3636

Stadler,-R; Otte,-H-G; Luger,-T; Henz,-B-M; Kuhl,-P; Zwingers,-T; Sterry,-W. Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. Blood. 1998 Nov 15; 92(10): 3578-3581

Starz H, Balda BR, Bachter D, Buchels H, Vogt H. Secondary lymph node involvement from primary cutaneous large B-cell lymphoma of the leg: sentinel lymph nodectomy as a new strategy for staging circumscribed cutaneous lymphomas. Cancer. 1999 Jan 1;85(1):199-207

Stein H, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Foss HD. Molecular biology of Hodgkin's disease. Cancer Surv. 1997;30:107-123

Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. Blood 1985, 66:848-858

Stein-H; Herbst-H; Anagnostopoulos-I; Niedobitek-G; Dallenbach-F; Kratzsch-HC. The nature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, their association with EBV, and their relationship to anaplastic large-cell lymphoma. Ann-Oncol. 1991 Feb; 2 Suppl 2: 33-38

Steinhoff M, Hummel M, Anagnostopoulos I et al: Single Cell Analysis of CD30+ Cells in Lymphomatoid Papulosis demonstrates a Common Clonal T-Cell Origin. Blood First Edition Paper, prepublished online April 17, 2002; DOI 10.1182/blood-2001-12-0199

Sterling JC, Marcus R, Burrows NP, Roberts SO. Erythrodermic mycosis fungoides treated with total body irradiation and

Stewart AK, Huang C, Long AA, Stollar BD, Schwartz RS. VH-gene representation in autoantibodies reflects the normal human B-cell repertoire. Immunol Rev. 1992 Aug;128:101-122

Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. J Invest Dermatol. 1983; 80: 12-16

Talpur R, Apisarnthanarax N, Ward S, Duvic M. Treatment of refractory peripheral T-cell lymphoma with denileukin diftitox (ONTAK). Leuk Lymphoma. 2002 Jan;43(1):121-126

Tilgner J, Golembowski S, Kersten B, Sterry W, Jahn S. VH genes expressed in peripheral blood IgE-producing B cells from patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol. 1997 Mar;107(3):528-535

Tilly H, Gaulard P, Lepage E, Dumontet C, Diebold J, Plantier I, Berger F, Symann M, Petrella T, Lederlin P, Briere J. Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical presentation, immunophenotype, and outcome. Blood 1997, 90:3727-3734

Tomlinson IM, Walter G, Jones PT, Dear PH, Sonnhammer EL, Winter G. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. J Mol Biol. 1996 Mar 15;256(5):813-817

Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. Nature. 1983 Apr 14;302(5909):575-581

Tonnies H, Stumm M, Wegner RD, Chudoba I, Kalscheuer V, Neitzel H. Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics. Cytogenet Cell Genet 2001, 93:188-194

Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction [see comments]. Blood 1991, 78:192-196

Tzioufas AG, Katsikis PD, Youinou PY, Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: an oligo-monoclonal B cell process. Clin Exp Rheumatol. 1990 Jul-Aug;8 Suppl 5:17-21

van der Putte SC, Toonstra J, van Wichen DF: B cells and plasma cells in mycosis fungoides. A study including cases with B cell follicle formation or a monotypical plasma cell component. Am J Dermatopathol. 1989 Dec;11(6):509-516

van Haselen CW, Vermeer MH, Toonstra J, van der Putte SC, Mulder PG, van Vloten WA, Willemze R. p53 and bcl-2 expression do not correlate with prognosis in primary cutaneous large T-cell lymphomas. J Cutan Pathol. 1997 Sep;24(8):462-467

Van Neer FJ, Toonstra J, Van Voorst Vader PC, Willemze R, Van Vloten WA. Lymphomatoid papulosis in children: a study of 10 children registered by the Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. Br J Dermatol. 2001 Feb;144(2):351-354

Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, Carlotti A, Franck N, Dechelotte P, Souteyrand P, Courville P, Joly P, Delaunay M, Bagot M, Grange F, Fraitag S, Bosq J, Petrella T, Durlach A, De Mascarel A, Merlio JP, Wechsler J. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneious Lymphomas. Blood. 2000 Apr 1;95(7):2212-2218

Vergier-B; Beylot-Barry-M; Pulford-K; Michel-P; Bosq-J; de-Muret-A; Beylot-C; Delaunay-MM; Avril-MF; Dalac-S; Bodemer-C; Joly-P; Groppi-A; de-Mascarel-A; Bagot-M; Mason-DY; Wechsler-J; Merlio-JP. Statistical evaluation of diagnostic and prognostic features of CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 65 cases. Am-J-Surg-Pathol. 1998 Oct; 22(10): 1192-1202

Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, van Voorst Vader PC, Geerts ML, van Vloten WA, Willemze R. Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. Arch Dermatol. 1996 Nov;132(11):1304-1308

Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM, Bjerrum KB, Braga S, Coll J, de Vita S, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. Arthritis Rheum. 1993 Mar;36(3):340-347

Volkenandt M, Burmer GC, Schadendorf D, Koch OM, Wienecke R, Degitz K. The polymerase chain reaction. Method and applications in dermatopathology. Am J Dermatopathol 1993, 15:118-126

Vonderheid EC. Treatment of cutaneous T cell lymphoma: 2001. Recent Results Cancer Res. 2002;160:309-320

Vonderheid EC; Tan ET; Kantor AF; Shrager L; Micaily B; Van-Scott EJ. Long-term efficacy, curative potential, and carcinogenicity of topical mechlorethamine chemotherapy in cutaneous T cell lymphoma. J-Am-Acad-Dermatol. 1989 Mar; 20(3): 416-428

Wang H-H, Myers T, Lach L-J, Hsieh C-C, Kadin M-E. Increased risk of lymphoid and nonlymphoid malignancies in patients with lymphomatoid papulosis. Cancer. 1999 ; 86: 1240-1245

Watsky KL, Longley BJ, Dvoretzky I. Primary cutaneous B-cell lymphoma. Diagnosis, treatment, and prognosis. J Dermatol Surg Oncol. 1992 Nov;18(11):951-954

Wellmann A, Otsuki T, Vogelbruch M, Clark HM, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcription-polymerase chain reaction in CD30+ anaplastic large-cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease. Blood. 1995 Sep 15;86(6):2321-2328

Whittaker S, Smith N, Jones R-R, Luzzatto L. Analysis of beta, gamma, and delta T-cell receptor genes in lymphomatoid papulosis: cellular basis of two distinct histologic subsets. J-Invest-Dermatol. 1991; 96: 786-791

Whittaker S. Clinical and prognostic significance of molecular studies in cutaneous T-cell lymphoma. Curr Top Pathol. 2001;94:93-101

Whittaker S. Molecular genetics of cutaneous lymphomas. Ann N Y Acad Sci. 2001 Sep;941:39-45

Whittemore AS, Holly EA, Lee IM, Abel EA, Adams RM, Nickoloff BJ, Bley L, Peters JM, Gibney C. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. J Natl Cancer Inst. 1989 Oct 18;81(20):1560-1567

WHO Clinical Advisory Committee meeting: Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid systems: Airlie House, Virginia, USA, November, 1997

Willemze R, Beljaards R-C. Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1)-positive lymphoproliferative disorders. A proposal for classification and guidelines for management and treatment. J-Am-Acad-Dermatol. 1993 ; 28: 973-980

Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, vanVloten WA, Meijer CJ. 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, 90:354-371

Willemze R, Meijer CJ. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a comparison with the R.E.A.L. Classification and the proposed WHO Classification. Ann Oncol. 200011:11-15

Williams SC, Frippiat JP, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc MP, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. J Mol Biol. 1996 Nov 29;264(2):220-232

Winkler TH, Fehr H, Kalden JR. Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. Eur J Immunol. 1992 Jul;22(7):1719-1728

Wood GS, Kamath NV, Guitart J, Heald P, Kohler S, Smoller BR, Cerroni L. Absence of Borrelia burgdorferi DNA in cutaneous B-cell lymphomas from the United States. J Cutan Pathol. 2001 Nov;28(10):502-507

Wood GS, Schaffer JM, Boni R, Dummer R, Burg G, Takeshita M, Kikuchi M. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. Am J Pathol. 1997 Feb;150(2):667-673

Wood GS. Lymphocyte activation in cutaneous T-cell lymphoma. J Invest Dermatol. 1995 Jul;105(1 Suppl):105-109

Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. Lancet. 1993 Sep 4;342(8871):575-577

Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet. 1991 Nov 9;338(8776):1175-1176

Wotherspoon AC, Pan LX, Diss TC, Isaacson PG. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. Cancer Genet Cytogenet. 1992 Jan;58(1):35-38

Ye H, Dogan A, Karran L, Willis TG, Chen L, Wlodarska I, Dyer MJ, Isaacson PG, Du MQ. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. Am J Pathol. 2000 Oct;157(4):1147-1154

Zackheim HS; Epstein EH; Crain WR. Topical carmustine (BCNU) for cutaneous T cell lymphoma: a 15-year experience in 143 patients. J-Am-Acad-Dermatol. 1990 May; 22(5 Pt 1): 802-810

Zackheim HS; Kashani-Sabet M; Amin S. Topical corticosteroids for mycosis fungoides. Experience in 79 patients. Arch-Dermatol. 1998 Aug; 134(8): 949-954

Zenahlik P, Fink-Puches R, Kapp KS, Kerl H, Cerroni L. [Therapy of primary cutaneous B-cell lymphomas] Hautarzt. 2000 Jan;51(1):19-24

Zenone T, Catimel G, Barbet N, Clavel M. Complete remission of a primary cutaneous B cell lymphoma treated with intralesional recombinant interferon alpha-2a. Eur J Cancer. 1994;30A(2):246-247

Zinzani-PL; Pileri-S; Bendandi-M; Buzzi-M; Sabattini-E; Ascani-S; Gherlinzoni-F; Magagnoli-M; Albertini-P; Tura-S. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. J-Clin-Oncol. 1998 Apr; 16(4): 1532-1537

Zoi-Toli O, Vermeer MH, De Vries E, Van Beek P, Meijer CJ, Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. Br J Dermatol 2000, 143:313-319

Abkürzungen

ALCL	anaplastic large cell lymphoma, großzelliges anaplastisches Lymphom
B-CLL	chronisch lymphatische Leukämie
bp	basepair, Basenpaar von Nukleinsäuren
bulk-DNA	DNA, welche aus der Gesamtheit einer Biopsie extrahiert wurde
C	konstanter Teil des Immunglobulins, welches durch Angabe der Kette gekennzeichnet ist, z.B. Cμ oder Cγ
CBCL	primär kutanes B-Zell-Lymphom
CDR	complementary determining region: Genregion, welche die Antigenbindung des Immunglobulins kodiert
CGH	complementary genom hybridisation, vergleichende Genomhybridisierung
CLA	cell-leukocyte adhesion molecule, Leukozyten-Adhäsionsmolekül
CR	komplette Remission
CTCL	primär kutanes T-Zell-Lymphom
CD	cluster of differentiation, Differenzierungsantigen auf Zelloberflächen
EBV	Epstein-Barr-Virus
FFA	Fluorescent fragment analysis, Flureszenz-Fragment-Analyse, kapillarelektrophoretisches Verfahren
FR	Framework: Genregion, welche für die Stabilität des Immunglobulins verantwortlich ist
HLA	Histokompatibilitätskomplex
H-RS	Hodgkin-Reed Sternberg
IgH	Immunoglobulin heavy, schwere Kette des Immunglobulins
IgL	limmunoglobulin light, leichte Kette des Immunglobulins
IL	Interleukin
IFN	Interferon
MALT	mucosae-associated lymphoid tissue, Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
ongoing mutation	fortlaufende Mutation
out of frame	Verschiebung der Nukleinsäuren um eine oder zwei Basenpaare
PR	partielle Remission
R-mutation	replacement mutation, Austauschmutation
S-mutation	silent mutation, stille Mutation
SALT	skin-associated lymphoid tissue, Haut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGGE	Temperaturgradienten-Gel-Elektrophorese
TH1	Subpopulation von T-Helferzellen (Produktion von IL2, IFN-γ, TNF-ß)
TH2	Subpopulation von T-Helferzellen (Produktion von IL4, IL5, IL10)
TNF	Tumornekrosefaktor
SALT	skin associated lymphoid tissue, Haut assoziiertes lymphatisches Gewebe
V	variabler Teil des Immunglobulins, welches durch Angabe der Kette gekennzeichnet ist, z.B. Vκ oder Vλ

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Sterry für die umfassende Ausbildung zur Fachärztin für Hautkrankheiten an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité sowie für die intensive Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Diese Unterstützung vermittelte mir viele wertvolle Anregungen für meine praktische und theoretische Arbeit. Stets wurden die Aspekte der Projekte gründlich diskutiert und die Ergebnisse kritisch aufgearbeitet. Besonders positiv ist aus meiner Sicht die Verbindung von Klinik und Forschung zu werten, welche eine hohe Motivation für die Arbeit erbrachte.

Desweiteren danke ich herzlich Herrn PD Dr. Sigbert Jahn. Durch seine großen Erfahrungen in der wissenschaftlichen Praxis und die systematische Vermittlung wissenschaftlicher Methoden konnte ich unter seiner Anleitung den Einstieg in die Welt der Forschung erlernen. Besonders sein Wissen über die Natur der B-Zellen führte zu sehr erfolgreichen Projekten in deren Folge mehrere Publikationen entstanden.

Auch Herrn Professor Ralf Küppers vom Molekulargenetischen Institut Köln gilt mein Dank. Durch die kollegiale und unkomplizierte Unterstützung bei der Etablierung der Methodik (Mikromanipulation und Einzelzell-PCR) wurde die Grundlage für die Arbeit an den vorgestellten Themen gelegt.

Frau Dr. Heike Audring danke ich für die histologische Beratung und Diskussion der klinischen und wissenschaftlich ausgewerteten Fälle sowie Herrn Dr. Lukowsky für die Unterstützung der molekularbiologischen Aspekte.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima. Zum einen haben die Studentinnen und Studenten wesentlich zum Fortgang unserer Arbeit beigetragen, zum anderen sicherten die MTA's Frau Kowacz, Frau Lehmann und Frau Siegel die fachlichen und organisatorischen Abläufe im Labor ab und unterstützten mich seelisch und moralisch in guten und in schlechten Zeiten.
Auch allen anderen Mitarbeitern des Hauses, allen ärztlichen Kolleginnen und Kollegen und dem Pflegepersonal möchte ich für die gemeinsame Patientenbetreuung danken, welche eine wichtige Voraussetzung für die wissenschaftliche Arbeit darstellt.

Abschließend danke ich aus ganzem Herzen meiner Familie. Meine Eltern weckten durch ihre eigene wissenschaftliche Tätigkeit das Interesse an Wissenschaft und Forschung. Sie unterstützten mich stets bei der Erreichung beruflicher und familiärer Ziele. Meinem Ehemann Jörg gebührt mein besonderer Dank, da er stets verstanden hat, die nötige Toleranz für das Berufsleben aufzubringen und mich durch seinen Enthusiasmus im Privatleben zu unterstützen. Auch unserem Sohn, Frank Friedrich, sei gedankt für die herzliche und selbständige Art, mich durch seine guten schulischen Leistungen und seine musikalische Entwicklung zu motivieren. Mein Dank gilt auch meinen Schwiegereltern, welche stets ein offenes Ohr für die Sorgen des Privatlebens haben und durch ihre pragmatische Hilfe auftretende Probleme stets schnell und unkompliziert lösen halfen..

Die Arbeiten wurden im Rahmen einer DFG-Forschergruppe, Teilprojekt kutane B-Zell-Lymphome, über 6 Jahre und durch ein Projekt CD30+ Lymphome über 2 Jahre gefördert. Die Forschungskommission der Charité förderte die Finanzierung neuer Ideen, die Bezahlung studentischer Hilfskräfte und das Publizieren der generierten Daten. Auch dafür vielen Dank!

Publikationsliste der Verfasserin über primär kutane Lymphome (chronologisch)

Gellrich S, Wilks A, Lukowsky A, Wernicke M, Müller A, Muche JM, Fischer T, Jasch KC, Audring H, Sterry W. T-cell receptor-γ gene analysis of CD30+ large atypical individual cells in CD30+ large primary cutaneous T-cell lymphomas. J Invest Dermatol. 2003 Apr;120(4):670-675

Fischer T, **Gellrich S**, Muche JM, Sherev T, Audring H, Neitzel H, Walden P, Sterry W, Tonnies H. Genomic aberrations and survival in cutaneous T cell lymphomas. J Invest Dermatol, akzeptiert am 04.03.2003

Gellrich S, Muche JM, Sterry W. Bexaroten bei kutanen T-Zell-Lymphomen. Arzneimitteltherapie 2003, 21; 34-34

Gellrich S, Muche JM, Jahn S, Sterry W. Studying primary cutaneous lymphomas by micromanipulation and single cell PCR – A review. Giornale Italiano di Dermatologia a venerologia 2002, Vol 137-N4; 231-238

Gellrich S, Muche JM, Sterry W. Primär kutane Lymphome. Klinikarzt 5-2002; 114-121

Gellrich S, Rutz S, Golembowski S, Jacobs C, von Zimmermann M, Lorenz P, Audring H, Muche M, Sterry W, Jahn S. Primary cutaneous follicle center cell lymphomas and large B cell lymphomas of the leg descend from germinal center cells. A single cell polymerase chain reaction analysis. J Invest Dermatol. 2001 Dec;117(6):1512-20.

Hombach A, Muche JM, Gerken M, **Gellrich S**, Heuser C, Pohl C, Sterry W, Abken H. T cells engrafted with a recombinant anti-CD30 receptor target autologous CD30(+) cutaneous lymphoma cells. Gene Ther. 2001 Jun;8(11):891-5

Gellrich S, Muche JM, Pelzer K, Audring H, Sterry W. [Anti-CD20 antibodies in primary cutaneous B-cell lymphoma. Initial results in dermatologic patients] Hautarzt. 2001 Mar;52(3):205-210

Linnemann T, Tumenjargal S, **Gellrich S**, Wiesmuller K, Kaltoft K, Sterry W, Walden P. Mimotopes for tumor-specific T lymphocytes in human cancer determined with combinatorial peptide libraries. Eur J Immunol. 2001 Jan;31(1):156-165

Gellrich S, Lukowsky A, Schilling T, Rutz S, Muche JM, Jahn S, Audring H, Sterry W. Microanatomical compartments of clonal and reactive T cells in mycosis fungoides: molecular demonstration by single cell polymerase chain reaction of T cell receptor gene rearrangements. J Invest Dermatol. 2000 Oct;115(4):620-4

Muche JM, Lukowsky A, Ahnhudt C, **Gellrich S**, Sterry W. Peripheral blood T cell clonality in mycosis fungoides -an independent prognostic marker? J Invest Dermatol. 2000 Sep;115(3):504-505

Asadullah K, Haeussler-Quade A, **Gellrich S**, Hanneken S, Hansen-Hagge TE, Docke WD, Volk HD, Sterry W. IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. Exp Dermatol. 2000 Aug;9(4):248-51

Muche JM, **Gellrich S**, Sterry W. Treatment of cutaneous T-cell lymphomas. Semin Cutan Med Surg. 2000 Jun;19(2):142-148

Gellrich S, Muche JM, Audring H, Sterry W. [Cutaneous B-cell lymphoma] Hautarzt. 2000 May;51(5):363-73; quiz 373-375

Golembowski S, **Gellrich S**, von Zimmermann M, Rutz S, Lippert S, Audring H, Lorenz P, Sterry W, Jahn S. Clonal evolution in a primary cutaneous follicle center B cell lymphoma revealed by single cell analysis in sequential biopsies. Immunobiology. 2000 Apr;201(5):631-644

Linnemann T, Wiesmuller KH, **Gellrich S**, Kaltoft K, Sterry W, Walden P. A T-cell epitope determined with random peptide libraries and combinatorial peptide chemistry stimulates T cells specific for cutaneous T-cell lymphoma. Ann Oncol. 2000;11 Suppl 1:95-99

Asadullah K, **Gellrich S**, Haeussler-Quade A, Friedrich M, Docke WD, Jahn S, Sterry W. Cytokine expression in primary cutaneous germinal center cell lymphomas. Exp Dermatol. 2000 Feb;9(1):71-76

Golembowski S, **Gellrich S**, Lorenz P, Rutz S, Audring H, Sterry W, Jahn S. Mainly unmutated V(H) genes rearranged in B cells forming germinal centers in a cutaneous pleomorphic T-cell lymphoma. J Cutan Pathol. 1999 Jan;26(1):6-12

Gellrich S, Rutz S, Borkowski A, Golembowski S, Gromnica-Ihle E, Sterry W, Jahn S. Analysis of V(H)-D-J(H) gene transcripts in B cells infiltrating the salivary glands and lymph node tissues of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 1999 Feb;42(2):240-247

Gellrich S, Jahn S, Audring H, Muche JM, Lukowsky A, Schulze P, Sterry W. Therapie der Lymphomatoiden Papulose mit Methotrexat. H+G, 1(73), 1998, 26-31

Forste N, **Gellrich S**, Golembowski S, Rutz S, Audring H, Sterry W, Jahn S. Analysis of V(H) genes rearranged by individual B cells in dermal infiltrates of patients with mycosis fungoides. Clin Exp Immunol. 1997 Dec;110(3):464-471

Gellrich S, Golembowski S, Audring H, Jahn S, Sterry W. Molecular analysis of the immunoglobulin VH gene rearrangement in a primary cutaneous immunoblastic B-cell lymphoma by micromanipulation and single-cell PCR. J Invest Dermatol. 1997 Oct;109(4):541-545

Muche JM, Lukowsky A, Asadullah K, **Gellrich S**, Sterry W. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood of patients with primary cutaneous T-cell lymphoma. Blood. 1997 Aug 15;90(4):1636-1642

Gellrich S, S.Rutz, S.Lippert, P.Lorenz, S. Golembowski, H. Audring, W.Sterry, S.Jahn. Studying Ig Genes in Single B Lymphocytes by Micromanipulation and Single Cell PCR. Biochemica, Boehringer Mannheim, 11/97

Eingereichte Publikationen

Gellrich S, Wernicke M, Wilks A, Lukowsky A, Müller A, Muche JM, Jasch KC, Audring H, Sterry W. Persistence of clonal T and B cells in lymphomatoid papulosis, type A, lesions outside the large atypical CD30+ cells, eingereicht in J Invest Dermatol (derzeit in Revision)

Sherev T and **Gellrich S**, Linnemann T, Muche JM, Lukowsky A, Audring H, Wiesmüller KH, Sterry W, Walden P. Tumor regression of cutaneous lymphoma induced by mimotope vaccination. in Revision, eingereicht in J. Immunol.

Eidesstattliche Versicherung

gemäß der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 14.05.2003 Dr. Sylke Gellrich