

Aus der Klinik für Dermatologie
Der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Qualitativer und quantitativer Nachweis monoklonaler Zellen in Blut
und Haut von Patienten mit Mycosis fungoides und Small Plaque
Parapsoriasis mittels klonspezifischer TCR-PCR**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätmedizin Berlin

Von
Jürgen Heim
aus Marktheidenfeld

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dummer, Dermatologische Klinik, Zürich
2. Prof. Dr. Dietel, Institut für Pathologie, Charité, Berlin
3. PD Dr. Lukowsky, Dermatologische Klinik, Charité, Berlin

Datum der Promotion: 18.07.2005

Abstract

Mit klonspezifischer Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein spezifischer Nachweis kleiner DNA-Mengen möglich. Von 47 MF-Patienten wurden aus Hautproben 50 TCR-gamma- und 7 TCR-beta-Sequenzen sequenziert, von 15 bzw. 5 Patienten gelang die Entwicklung eines N-spezifischen Primers. Um einen Zusammenhang zwischen Frequenz der zirkulierenden klonalen Zellen und klinischem Verlauf zu untersuchen, wurden für 4 Patienten im LightCycler die im Blut zirkulierenden klonalen Rearrangements quantifiziert. Ein Vergleich dieser Daten mit dem klinischen Verlauf ergab bei zwei Patienten eine Tendenz zu einem reziproken Verhältnis, bei einem Patienten im Tumorstadium wurde eine gleichsinnige Entwicklung beider Parameter gesehen. Der Nachweis klonaler Rearrangements in Haut- und Blutproben von SPP-Patienten wäre ein Hinweis auf den Lymphomcharakter dieser Erkrankung. Bei 9 von 14 SPP-Patienten wurde in Blutproben mit Hilfe der für Vgamma1/2 spezifischen Konsensusprimer ein monoklonales Rearrangement gefunden. Für 6 Patienten konnte ein klonspezifischer Primer entwickelt werden. Ein Nachweis der klonalen Sequenz aus dem Blut in der Haut war trotz einer geschachtelten PCR nicht möglich.

klonspezifische Polymerasekettenreaktion, Mycosis fungoides, Small Plaque Parapsoriasis, real time-PCR

Abstract

By clone specific polymerase chain reaction (pcr) small amounts of DNA can be detected. We discovered 50 tcr gamma and 7 tcr beta sequences from skin probes of 47 patients with mycosis fungoides. From 15 respectively 5 patients n-specific primers were designed. In order to examine if there is a relation between frequency of circulating clonal cells and clinical course, for 4 patients circulating clonal cells were quantified by real time pcr in LightCycler. In two patients we saw a reciproke proportion, in one patient with tumourstage disease rising numbers of circulating clonal cells were seen during worsening of clinical course.

Detection of clonal rearrangments in skin and blood probes of patients with small plaque parapsoriasis could be a hint for classifying SPP as a lymphoma. In 6/14 patients we designed a clone-specific primer for circulating clonal rearangments. Despite performing a nested pcr circulating clonal rearrangments could not be detected in skin lesions of these patients.

clone-specific polymerase chain reaction, mycosis fungoides, real time pcr, small
palque parapsoriasis

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	7
1 EINLEITUNG	9
1.1 Kutanes T-Zell-Lymphom / Mycosis fungoides	9
1.1.1 Definition	9
1.1.2 Vorkommen	9
1.1.3 Ätiologie	9
1.1.4 Pathophysiologie	10
1.1.5 Klinische Präsentation der MF	12
1.1.6 Diagnostik und Staging	13
1.2 Parapsoriasis en plaques	17
1.2.1 Definition	17
1.2.2 Small Plaque Parapsoriasis (SPP)	17
1.2.3 Beziehung zu Mycosis Fungoides	18
1.3 Molekularbiologie des kutanen T-Zell-Lymphoms	19
1.3.1 Techniken der Genotypisierung	19
1.3.2 Genotypisierung und Sequenzierung	28
1.4 Fragestellung	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Patienten MF / SPP	34
2.2 Material	35
2.2.1 Chemikalien	35
2.2.2 Software	36
2.3 Genotypisierung	37
2.3.1 DNA-Isolation	37
2.3.2 TCR- β -PCR	38
2.3.3 TCR- γ -PCR	38
2.3.4 Agarosegelelektrophorese	40
2.3.5 TGGE	41
2.3.6 Sequenzierung	41
2.4 Klonspezifische PCR	42
2.4.1 Entwicklung eines N-spezifischen Primers	42
2.4.2 Optimierung der Bedingungen der klonspezifischen PCR	43

2.5	Quantifizierung mittels SYBR-Green	44
2.6	Spezifitätsprüfung	45
2.7	Korrelation zur Klinik	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Quantifizierung klonaler Zellen in peripherem Blut von MF-Patienten	47
3.2	Sequenzierungsergebnisse	47
3.2.1	Klonspezifische Primer	48
3.2.2	Spezifität und Sensitivität der klonspezifischen PCR	51
3.2.3	Detektion zirkulierender, klonaler Zellen im Verlauf	53
3.2.4	Quantifizierung	55
3.3	TCR-Klonalität bei Patienten mit SPP	62
3.3.1	Nachweis klonaler Zellen in Blut- bzw. Hautproben	62
3.3.2	Sequenzierung und Entwicklung klonspezifischer Primer	62
3.3.3	Ergebnisse der klonspezifischen PCR in Haut- und Blutproben	63
4	Diskussion	67
4.1	Methodendiskussion	67
4.1.1	Validität der Ergebnisse der PCR mit Konsensusprimern und Auftrennung mittels TGGE	67
4.1.2	Validität der quantitativen PCR	68
4.1.3	Validität der quantitativen PCR	71
4.2	Diskussion der Ergebnisse	79
4.2.1	Diskussion der Sequenzierungsergebnisse	79
4.2.2	Diskussion der Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Konsensus-PCR mit TGGE und klonspezifischer PCR	80
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse der Quantifizierung	81
4.2.4	Diskussion der Ergebnisse bei SPP-Patienten	86
5	Zusammenfassung	89
	LITERATURVERZEICHNIS	91

Abkürzungsverzeichnis

ATLL	Adulte T-Zelleukämie /Lymphom
Bp	Basenpaare
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGH	Komparative Genomhybridisierung
CLA	<i>cutaneous lymphocyte antigen</i>
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECP	Extrakorporale Photophorese
EORTC	European Organisation for research and treatment of cancer
GC-Anteil	Guanin-Cytosin-Anteil
HIV	Humanes Immunodeficiency Virus
HLA	Histokompatibilitätskomplex
HTLV-1	Humanes T-Zell-Lymphotropes Virus Typ I
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
IP 10	induzierbares Protein 10
KO	Körperoberfläche
LFA	Lymphocytenfunktions-assoziiertes Antigen
LPP	<i>Large plaque parapsoriasis</i>
MF	Mycosis fungoides
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTX	Methotrexat
NK	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PUVA	Psoralen plus UVA
sIL-2R	<i>soluble Interleukin 2 receptor</i>
SPP	<i>Small Plaque Parapsoriasis</i>

SSCP	<i>single-stranded conformation polymorphism</i>
T-ALL	akute T-Zell-Lymphoblasten-Leukämie
TARC	<i>Thymus and activation regulated chemokine</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TGGE	Thermogradienten Gelelektrophorese
TNM	<i>tumor/nodes/metastasis</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Kutanes T-Zell-Lymphom / Mycosis fungoides

1.1.1 Definition

Die Mycosis fungoides (MF) ist ein peripheres T-Zell-Lymphom niedriger Malignität mit primär kutaner Manifestation. Die Erkrankung verläuft chronisch und mit langsamer Progression durch klinisch unterscheidbare Stadien und manifestiert sich nach Jahren oder Jahrzehnten regelmässig zusätzlich in Lymphknoten, seltener auch extranodal in inneren Organen (15). Die atypischen Zellen haben eine charakteristische, zerebriforme Morphologie und sind immunphänotypisch CD4- und CDw 29-positiv (*Skin homing-Zellen*) (92).

Die MF wurde erstmals 1806 von Alibert-Bazin (4) als eigene Entität beschrieben. In der 1997 veröffentlichten EORTC-Klassifikation (112) wird die MF als indolentes primär kutanes T-Zell-Lymphom (CTCL) eingestuft. MF mit follikulärer Muzinose, pagetoide Retikulose und Granulomatous slack skin werden nicht mehr als Varianten der MF, sondern aufgrund unterschiedlicher Klinik und Pathologie als eigene Entitäten geführt.

1.1.2 Vorkommen

MF ist eine seltene Erkrankung, die Inzidenz beträgt in Europa 0,19 (24), in den USA 0,29/ 100 000 Einwohner. Menschen mit schwarzer Hautfarbe haben ein größeres Erkrankungsrisiko als Weiße, das Geschlechtsverhältnis Männer : Frauen beträgt 2,2:1 (110). Der Erkrankungsgipfel liegt im mittleren Alter, 64% der neu erkrankten Patienten einer amerikanischen Multicenterstudie waren zwischen 45 und 69 Jahre alt (44). Mit 44% ist MF das am häufigsten vorkommende kutane Lymphom (112).

1.1.3 Ätiologie

Die malignen T-Zellen in frühen MF-Läsionen zeigen die Tendenz, sich um Langerhans-Zellen herum anzulagern (93), was zu der Vermutung führte, chronische Antigenstimulation führe zur Proliferation der malignen Zellen.

Morales et al. (73) fanden jedoch keinen Einfluss einer chronischen Stimulation durch Infektionen und atopische Erkrankungen, die MF-Patienten und die Kontrollgruppe unterschieden sich lediglich in einer höheren Prävalenz von Psoriasis und Urtikaria.

Da die MF einige klinische und pathologische Aspekte mit der mit Humanem T-Zell-lymphotropen Virus-Typ I (HTLV-I) assoziierten ATLL (adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom) teilt, wurde ausserdem ein Retrovirus als Pathogen für die MF postuliert. Bei 92 % der untersuchten MF-Patienten konnten in den Vereinigten Staaten durch PCR in PBMC die proviralen HTLV-Sequenzen pol oder tax nachgewiesen werden (115). Dagegen konnte in Japan, das ein HTLV-I-Endemiegebiet darstellt, bei keinem der 50 untersuchten CTCL-Patienten HTLV I-provirale DNA dokumentiert werden (59). Gesichert ist eine Seropositivität für HTLV-I bei 15% der MF-Patienten, die höher als bei der Normalbevölkerung ist (115). Für HIV-1 und EBV konnte eine Rolle als Pathogen ausgeschlossen werden (56,103).

Als Hinweis auf eine genetische Disposition für MF konnte eine familiäre Häufung nicht gesehen werden. Bei MF-Patienten konnten am häufigsten die HLA-Antigene HLA-B 8, AW31 und AW3 nachgewiesen werden (99).

In chromosomalen Strukturanalysen konnten bei MF-Patienten zwar Chromosomenaberrationen in allen Stadien gesehen werden, jedoch konnten keine einheitlichen, klonalen Aberrationen nachgewiesen werden (57,77). Neben strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen könnten Mutationen von Onkogenen bei der Genese von MF eine Rolle spielen, jedoch waren weder Mutationen des Tumorsuppressorgenes p53 noch das bcl-2-Protein, p62, p21 und PCNA bei CTCL-Patienten signifikant erhöht (42).

1.1.4 Pathophysiologie

T-Zellen können von der Dermis über Lymphbahnen und regionale Lymphknoten ins Blut und von dort über selektive Adhäsionsmoleküle an den Endothelzellen der Kapillaren wieder zurück in die Dermis wandern. Diese Rückkehr in die Haut wird *homing* genannt und durch von T-Zellen exprimierte CLA-Marker (*cutaneous lymphocyte antigen*) vermittelt. Naive T-Zellen reifen in einem drainierenden Lymphknoten und werden zu CD45R0-positiven Memory-T-Zellen aktiviert, die CLA exprimieren. Eine aktivierte T-Zelle kann zur Immunabwehr in die Haut wandern durch Vermittlung des sich auf den Endothelzellen der Hautkapillaren befindlichen E-Selektins. Ausserdem interagieren das von allen T-Zellen exprimierte Lymphozytenfunktions-assoziierte Antigen 1 (LFA-1) mit dem von Keratozyten nach

Stimulation durch Interferon γ (IFN γ) produzierte interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Das von Endothelzellen abgegebene Zytokin TARC und durch IFN- γ induziertes IP-10 (induzierbares Protein 10) erhöhen die Spezifität der Adhäsion (6,23). Bei der MF handelt es sich um eine maligne Entartung von CLA-positiven Memory-T-Zellen, welche einen Epidermotropismus zur Haut aufweisen (92). Dass die malignen T-Zellen weitgehend die Homing-Mechanismen der ihnen entsprechenden normalen T-Zellen beibehalten, zeigt das weitgehende Fehlen viszeraler Metastasen trotz Rezirkulation.

Ein wichtiger Faktor für den Verbleib der malignen Zellen in der Haut scheinen Zytokine zu sein.

IL-15-mRNA konnte in von Sézary-Patienten und anderen CTCL-Zelllinien gewonnenen T-Zellen in überdurchschnittlicher Menge nachgewiesen werden. IL-15 (Interleukin 15) stimuliert das Wachstum von Sézary-Zelllinien (32). Immunhistologischen Analysen zufolge wird es in MF-Läsionen sowohl von den Keratozyten der Basalzellschicht als auch von den infiltrierenden Lymphozyten gebildet (32).

Als weiterer, wichtiger Faktor in der Pathogenese wird IL-7 diskutiert. Es erwies sich in Tiermodellen und in In-vitro-Experimenten als wichtiger Wachstumsfaktor für CTCL-Zellen: IL-7 besitzt einen stark wachstumsfördernden Effekt auf Sézary-Zellen (26), ausserdem entwickeln für IL-7 transgene Mäuse eine progressive Hauterkrankung mit dermalen T-Zell-Infiltraten und generalisierte lymphoproliferative Erkrankungen, die maligne entarten (90). Mittels PCR konnten in MF-Hautläsionen aber nur geringe Mengen an IL-7-mRNA nachgewiesen werden (5), weshalb eine IL-7-Überproduktion bei MF unwahrscheinlich ist.

In der läsionalen Epidermis wird ausserdem IP-10 überexprimiert und wirkt chemotaktisch auf CD4+ Lymphozyten. Eine stadienabhängige Abnahme von in MF-Läsionen produziertem IFN γ und das dadurch induzierbare Protein IP-10 gibt eine mögliche Erklärung für den Verlust des Epidermotropismus der malignen Zellen, der im Tumorstadium erfolgt (6).

CD4-positive T-Zellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterteilt, bei der MF besteht die maligne Zellpopulation aus CD4-positiven Th2-Zellen. Es wurden jedoch auch einzelne MF-Fälle mit CD8-positiven malignen Klonen gefunden (92). Da in frühen MF-Läsionen neben den malignen Th2-Zellen auch IFN γ -produzierende Th1-Zellen gefunden und

deren Zytokine als einander entgegengesetzt wirksam angesehen werden, nimmt man an, dass diese Th1-Zellen das Wachstum der malignen Th2-Zellen hemmen (48).

Hinweise auf eine lokale Tumorabwehr konnte der Nachweis einer grossen Anzahl CD8-positiver T-Zellen in frühen MF-Läsionen liefern zusammen mit einer positiven Korrelation zwischen Prognose und CD8-Zellzahl (6). Die erhöhte Expression von Antigenen zur Aktivierung der T- und natürlichen Killerzellen deuten auf eine systemische, gegen den Tumor gerichtete Immunantwort hin. Der nach extrakorporaler Photophorese erfolgende Anstieg der Zahl natürlicher Killerzellen im Blut weist auf eine Aktivierung der systemischen Tumorabwehr durch diese Therapieform hin (9).

Während des Fortschreitens der Krankheit vom prämykoiden ins infiltrative und mykoid (Tumor-) Stadium konnte in den Hautläsionen ein Anstieg von IL-10 und eine Abnahme von IFN γ -mRNA nachgewiesen werden. Vor allem IL-10, welches immunsuppressiv wirkt, scheint bei der für die Tumorprogression wichtigen Abnahme der Antitumorimmunreaktion eine wichtige Rolle zu spielen. (6). Im Gegensatz zur Aktivität der zytotoxischen Zellen nimmt die Expression von Granzym A in weiter fortgeschrittenen MF-Stadien zu (7). Eine mögliche Produktion durch die malignen T-Zellen und die Induktion der Apoptose zytotoxischer Zellen könnte dafür eine Erklärung sein.

1.1.5 Klinische Präsentation der MF

D'Alibert-Bazin (4) beobachteten 1806 bei MF-Patienten das Auftreten unterschiedlicher Infiltratformen im typischen, zeitlichen Verlauf. Je nach vorherrschendem Infiltrattyp wurden 3 aufeinander folgende Phasen unterschieden: das prämykoid, das infiltrative und das mykoid (tumoröse) Stadium (s. Tab. 1).

Tab. 1: Stadieneinteilung bei MF

Stadien der Mycosis fungoides

-
1. Prämykoides (Ekzem-) Stadium
 2. Infiltratives (Plaque-) Stadium
 3. Mykoides (Tumor-) Stadium
-

Das prämykösische Stadium kann sich über Jahre hin entwickeln und zunächst klinisch uncharakteristisch bleiben. Charakteristisch ist die Heteromorphie der Hauterscheinungen, es kommen scharf begrenzte Herde mit unterschiedlicher Größe und Form vor, die verschieden stark gerötet sind. Sie können pityriasiforme und psoriasiforme Schuppung zeigen, oder selten vesikulös oder bullös und mit Krusten bedeckt sein. Prädilektionsstellen sind der laterale Rumpf und die Innenseiten der Oberschenkel und Oberarme, es kann ausgeprägter Juckreiz bestehen.

Das infiltrative (Plaque-) Stadium ist krankheitstypisch und zeigt eine zunehmende Infiltration der Herde. Es finden sich scharf begrenzte, plattenartig infiltrierte, schuppige oder verkrustete Herde mit entzündlich- bis bräunlich-roter Farbe. Auffällig innerhalb der sich langsam vergrößernden Herde sind scharf begrenzte Inseln normaler Haut (*nappes claires*). Der Juckreiz kann mäßig bis stark ausgeprägt sein. Umschriebene Alopezien deuten auf Herde am Kapillitium hin.

Das mykösische Stadium entwickelt sich als tumoröse Phase oft erst nach mehrjähriger Krankheitsdauer. Innerhalb plattenförmig infiltrierter Herde oder de novo bilden sich halbkugelige oder gelappte, rötlich-blaue bis braunrote Tumoren, die oberflächlich erodieren und ulzerös zerfallen können.

Im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit breitet sich die MF auch extrakutan aus, wobei die Wahrscheinlichkeit mit dem Grad des Hautbefalls wächst. Als erstes kommt es zur Infiltration der Lymphknoten, später auch der inneren Organe. Befallen werden meist Knochenmark, Milz, Leber und ZNS (15).

1.1.6 Diagnostik und Staging

Im prämykösischen Stadium können die Hauterscheinungen dem nummulären oder atopischen Ekzem, der Psoriasis, dem Pemphigus vulgaris oder dem Lichen simplex chronicus ähneln. Schlechtes Ansprechen auf die für die Dermatose übliche Therapie, häufige Rezidive, Zunahme der Herde und Besserung nach Sonnenbestrahlung sollten an die MF denken lassen und zur Biopsie mehrerer Herde führen (15).

1.1.6.1 Histopathologie

Im prämykösischen Stadium zeigt die Epidermis fokale Para- und Hyperkeratose und unregelmässige Akanthose. Zytologisch überwiegen kleine, lymphoide Zellen, nukleäre Atypien sind ausser bei hoher Vergrößerung nur zu erahnen. Atypische, oft

zerebriforme Kernkonturen sind in kunststoffeingebettetem Gewebe oder elektronenmikroskopisch zu erkennen. Im Stratum papillare des Koriums findet sich eine leichte Fibrose, ansonsten ein nur angedeutetes bandförmiges Infiltrat mononukleärer, überwiegend lymphoider Zellen.

Im infiltrativen Stadium sind die histologischen Veränderungen so ausgeprägt, dass die Diagnose sicher zu stellen ist. Als typisch gilt die umschriebene, lakunäre Ansammlung von lymphoiden Zellen und Makrophagen in der Epidermis (Pautrier-Mikroabszesse). Häufiger kommt jedoch die Einwanderung einzeln liegender, lymphozytärer Zellen vor (Einzelzellepidermotropismus). Die lymphoiden Zellen zeigen Zell- und Kernpolymorphie mit hyperchromatischen, irregulär begrenzten (zerebriformen) Kernen, gelegentlich mit Mitosen.

Im mykosiden Stadium geht der Epidermotropismus der Infiltratzellen zurück, das tumoröse Infiltrat reicht bis in die Subkutis. Jetzt überwiegen die hyperchromatischen, atypischen Lymphozyten mit zerebriformer Kernformation (15).

1.1.6.2 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung ist eine Methode zur Charakterisierung der malignen Zelle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen sogenannte CD (*Cluster of Differentiation*)-Antigene auf der Oberfläche von Zellen. MF-Zellen exprimieren CD4, gelegentliche Fälle einer CD8-Expression sind beschrieben (54,92,102). Sie gehören zum CD-45R0 (220kD Isoform des Leukozytenantigens CD45R) und CD29 positiven *helper inducer* -Phänotyp. Im Gegensatz zu den meisten anderen Typen von T-Zell-Lymphomen bleibt bei MF-Zellen die Expression der Pan-T-Zellmarker CD2, CD3 und CD5 bis zum Tumorstadium bzw. bis zum Lymphknotenbefall erhalten (53). Nur etwa zehn Prozent der MF-Fälle zeigen eine Pan-T-Zellmarkerdefizienz der die Epidermis infiltrierenden T-Zellen (71).

Zwei Drittel der MF/SS-Fälle zeigen eine Leu-8- und Leu-9-(CD7)-Defizienz (10). Da diese jedoch in kutanen T-Zellinfiltraten weit verbreitet ist und auch bei benigner Genese der Läsion vorkommt (49), ist das Fehlen bzw. ein Mangel von Leu-8 und CD-7 nur in reaktiven Lymphknoten und im Blut diagnostisch relevant (62).

Um zwischen reaktiven und malignen Infiltrationen zu unterscheiden, wurde das Verhältnis von CD4+- zu CD8+-Zellen untersucht. Entgegen den Ergebnissen früherer Studien konnte nur bei 32% der MF-Patienten eine CD4/CD8-Ratio grösser 10

gefunden werden, bei 19/29 Patienten war die Ratio mit Werten zwischen 4 und 10 nicht signifikant erhöht (53). Patienten mit höherer Ratio haben eine schlechtere Prognose (8).

Nur in 20 % der Fälle (76) wird auf MF-Zellen der Interleukin-2-Rezeptor (CD-25), der auf Zellen anderer T-Zell-Lymphome vorhanden ist, exprimiert. Andererseits werden erhöhte Serumspiegel von löslichem Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) und eine inverse Korrelation zwischen sIL-2R-Spiegeln und der NK- (Natürliche Killer-) Zellaktivität beschrieben. Stark erhöhte sIL-2R-Spiegel sind als prognostisch ungünstig für Patienten mit MF bewertet worden (36).

1.1.6.3 Genotypisierung

Neben Histologie und Immunphänotypisierung hat sich in den letzten Jahren die Genotypisierung, d.h. die Identifizierung klonaler T-Zellen mittels T-Zell-Rezeptor-(TCR-)Analyse etabliert. Die Techniken dazu sind detailliert unter Kapitel 1.3.1 dargestellt.

1.1.6.4 Staging

Staging-Untersuchungen beinhalten neben der Untersuchung des gesamten Integuments und der tastbaren Lymphknoten eine Röntgen-Thorax-Aufnahme und eine Oberbauchsonographie. Pathologische Befunde werden mittels Computertomographie und Biopsien, von histologischer Untersuchung gefolgt, spezifiziert. Die Bestimmung des Befalls von Haut, Lymphknoten und viszeralen Organen erlaubt die Einordnung des Krankheitsstadiums nach dem *tumor/nodes/metastasis*- (TNM-) System (s.Tab. 2) und davon abhängig die Auswahl der adäquaten Therapie (76).

Tab. 2: TNM-Stadieneinteilung nach EORTC (75), KO: Körperoberfläche

Stadium	T (Tumor)	N (Lymphknoten)	M (Metastasen)
I A	Patch u. Plaques<10% KO	keine Lymphadenopathie	keine
I B	Patch u. Plaques>10% KO	dto.	keine
II A	Patch u. Plaques	Lymphadenopathie, unspez. Pathol.	keine
II B	Tumor >1 (T3)	Unspez. Pathol.	keine
III	Erythroderma (T4)	dto.	keine
IV A	unabhängig	Spezifische Lymphknotenpathologie	keine
IV B	unabhängig	unabhängig	viszeraler Befall

1.1.6.5 Therapie

Topische Therapieformen der MF sind auf Krankheitsstadien beschränkt, in denen nur die Haut befallen ist. Kortikosteroide führen im Stadium IA bei bis zu 60% der Patienten zur kompletten Remission (114). Die lokale Anwendung der Chemotherapeutika Carmustin und Mechlorethamin bewirken in T1- und T2-Stadien mit ca. 80% vergleichbare Remissionsraten, in höheren Krankheitsstadien ist Carmustin Mechlorethamin unterlegen (113). Die lokale Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder schnellen Elektronen ist auf das Tumorstadium begrenzt. Eine Bestrahlung des gesamten Integuments mit schnellen Elektronen induziert bei 90% der Patienten im Stadium IA und bei 64% im Stadium III Langzeitremissionen, ist aber aufgrund schwerer Nebenwirkungen auf therapierefraktäre Fälle beschränkt (51).

Die Bestrahlung mit UV-Licht in Verbindung mit Photosensibilisatoren hat neben dem lokalen auch einen systemischen, immunmodulierenden Effekt. UVA-Bestrahlung nach systemischer oder lokaler Applikation von Psoralen (PUVA) führt bei bis zu 90% der im Stadium I-IIa Erkrankten zur kompletten Remission (50), die extrakorporale Behandlung angereicherter Leuko- und Lymphozyten mit Psoralen und UVA (extrakorporale Photophorese, ECP) erzielt vergleichbare Remissionraten bei MF im erythrodermalen Stadium (38).

Der Einsatz von Denileukin/diphthitox (ONTAK®), das als mit der zytotoxischen α -Kette des Diphtherietoxins fusioniertes IL2 an IL2-Rezeptor exprimierende Tumoren angreift, ist genau wie monoklonale Antikörper gegen CD4 und die Vakzinierung mit tumorspezifischen Peptiden noch experimenteller Natur, könnte in Zukunft aber neue Therapieansätze liefern (76,77).

Da schon in frühen Krankheitsstadien zirkulierende, maligne Zellen nachweisbar sind, werden auch schon in frühen Krankheitsstadien lokale mit systemischen Therapeutika kombiniert. 74,6% von 63 Patienten (davon 46 in den Stadien I-IIA) erreichten eine komplette Remission mit PUVA kombiniert mit IFN α , das die Produktion von Typ II-Zytokinen reduziert. Ungefähr der gleiche Anteil der Patienten blieb 5 Jahre und länger ohne Krankheitserscheinungen (24). Eine Dosisverringerung und Verlängerung der rezidivfreien Zeit ist durch die Zugabe von Retinoiden möglich.

Orale Chemotherapien mit Methotrexat oder Chlorambucil und Prednisolon werden im Tumorstadium angewandt, bei systemischer Erkrankung ist eine Kombinationschemotherapie nach dem CHOP-Schema die Therapie der Wahl (76).

1.2 Parapsoriasis en plaques

1.2.1 Definition

Der Begriff Parapsoriasis wurde 1902 erstmals von Brocq (21) verwendet, um eine Gruppe chronischer Hauterkrankungen unbekannter Ursache zu beschreiben, die einen Mangel an charakteristischen Symptomen und ein Nichtansprechen auf Therapie gemeinsam hatten. Dabei unterschied er drei Formen: Parapsoriasis en gouttes, Parapsoriasis en plaques und Parapsoriasis lichenoide. Heute wird die guttate Form als Pityriasis lichenoides chronica bzw. acuta bezeichnet, Parapsoriasis lichenoide als Parakeratosis variegata. 1962 trennte Palmer das erste Mal zwischen einer gross- und einer kleinfleckigen Form der Parapsoriasis en plaques (engl.: *Small plaque parapsoriasis* und *Large plaque parapsoriasis*). Bis heute gibt es keine einheitliche Nomenklatur dieser Krankheiten. Es existieren für einige Krankheitsbilder eine Vielzahl von Bezeichnungen, von denen jedoch unklar ist, ob es sich dabei um Varianten einer Erkrankung oder um verschiedene Entitäten handelt. Die Uneinheitlichkeit illustriert z.B. die Tatsache, dass in den USA die grossfleckige Form als Parapsoriasis en plaques bezeichnet wird, in Grossbritannien die kleinfleckige Form (63).

Diese Arbeit konzentriert sich auf die nach Lambert und Everett (63) als kleinfleckige Parapsoriasis (Parapsoriasis en petites plaques, *Small plaque Parapsoriasis*, SPP) klassifizierten Fälle.

1.2.2 Small Plaque Parapsoriasis (SPP)

Untersuchungen zur Inzidenz der SPP gibt es keine. Die Erkrankung ist selten, tritt im mittleren und höheren Alter auf mit einem Peak in der fünften Dekade. SPP zeigt ein Geschlechtsverhältnis m:w von 3:1 (52).

1.2.2.1 Klinischer Verlauf

Das klinische Erscheinungsbild der SPP ist durch gut begrenzte, runde oder ovale Effloreszenzen charakterisiert, die eine leichte Schuppenbildung aufweisen, aber im

Gegensatz zur LPP nicht verhärtet sind. Es handelt sich um Makulae von erythematöser, gelber oder brauner Farbe mit typischerweise weniger als 5 cm Durchmesser. Prädilektionsorte sind der Rumpf und die Innenseiten der proximalen Extremitäten. Bei der ebenfalls zur SPP gerechneten Digitate dermatosis sind die Läsionen von länglicher Form. Die Färbung der Flecken ist bei jedem Patienten einheitlich, variiert aber von Patient zu Patient. Die Perstans xanthoderma ist durch eine gelbliche Färbung charakterisiert, ansonsten stimmt das Erscheinungsbild mit dem der Digitate dermatosis überein.

Es kommt vor, dass die Patienten über eine leichte Irritation der Haut klagen, ansonsten zeigen sie keine Symptome (63).

1.2.2.2 Histologie

Das histologische Bild der SPP zeigt typischerweise ein perivaskuläres, teils bandartig konfluierendes Infiltrat lymphohistiozytärer Zellen in der oberen Dermis. Vereinzelt können lymphoide Zellen in die Epidermis aufsteigen, zelluläre Atypien fehlen im Gegensatz zur MF (63).

1.2.2.3 Therapie

Da die SPP nicht progredient (63) und meist symptomlos ist, erscheint es vertretbar, diese Patienten nur zu beobachten und unbehandelt zu lassen. Sollte der Patient über Pruritus klagen, kann mit pflegenden Externa, Teerpräparationen und topischen Steroiden und / oder mit UVB-Phototherapie behandelt werden (52). Durch die Therapie lässt sich nur eine zeitweise Remission der Hauterscheinungen erreichen (22).

1.2.3 Beziehung zu Mycosis Fungoides

Die Beziehung der beiden Formen der Parapsoriasis en plaques zu Mycosis fungoides wird unterschiedlich bewertet und ist nicht gesichert. Die Einstufung von LPP als prämaligener Vorgänger der MF ist anerkannt, die Zahl der LPP-Patienten, die eine MF entwickeln, liegt zwischen 10 und 30 % (63,64).

Die Bewertung der kleinfleckigen Parapsoriasis ist dagegen umstritten. Auch bei SPP-Fällen wurden wie bei CTCL monoklonale T-Lymphozyten gefunden, was jedoch nicht zwingend die Einordnung der SPP als maligne Erkrankung bedeutet (47).

Die Prozentzahlen der SPP-Fälle, die in MF übergehen, reichen in der Literatur von 0 % (96) bis 46% (40). Die Gründe für diese Unterschiede können in der schwierigen Differentialdiagnose zwischen SPP und früher MF liegen, aber auch an der Tatsache, dass eine kleinfleckige Parapsoriasis, die in eine MF übergeht, nachträglich als frühe MF eingeordnet wurde (22).

Einige Autoren (3) setzen aufgrund der Ähnlichkeit des klinischen Erscheinungsbildes die kleinfleckige Parapsoriasis und Mycosis fungoides gleich. Andere (22,63) ordnen sie aufgrund des klinischen Verhaltens und der Tatsache, dass hier eine monoklonale T-Zellpopulation nachweisbar sein kann, als CTCL ein und bezeichnen sie aufgrund der fehlenden Progredienz als „abortives Lymphom“. Da die SPP im Gegensatz zur MF keine Progredienz aufweist, sehen wir SPP als eigene, benigne Krankheitsentität an.

1.3 Molekularbiologie des kutanen T-Zell-Lymphoms

1.3.1 Techniken der Genotypisierung

Überlegungen zur Entstehung der Mycosis fungoides gehen davon aus, daß eine T-Zelle aufgrund eines Stimulus beginnt, unkontrolliert zu wachsen und einen malignen Klon von T-Lymphozyten bildet. Kann in einer verdächtigen Hautläsion ein monoklonales TCR-Rearrangement nachgewiesen werden, ist dies ein diagnostischer Hinweis auf ein kutanes T-Zell-Lymphom. Ein monoklonales Infiltrat kann in Hautproben von bis zu 49% der Patienten mit Lichen sclerosus et atrophicus (70,88) nachgewiesen werden, in seltenen Fällen bei jenen mit Pityriasis lichenoides acuta und Sklerodermie, ausserdem mit kutaner lymphoider Hyperplasie, follikulärer Muzinose, der allergischen und toxischen Kontaktdermatitis, mit Psoriasis vulgaris, Lichen ruber und angeborenen, erworbenen und iatrogenen Immundefekten (43). Im Blut wurden klonale Zellen auch bei gesunden Probanden nachgewiesen (100). Deshalb bedeutet Monoklonalität nicht zwingend die Malignität der Läsion, sondern die Diagnose eines CTCL sollte nur in Zusammenschau von typischer Klinik, histologischen und molekularbiologischen Ergebnissen gestellt werden.

1.3.1.1 T-Zell-Rezeptoren

T-Lymphozyten exprimieren Rezeptoren, die Antigene in Verbindung mit HLA-Molekülen erkennen. Diese T-Zell-Rezeptoren (TCR) bestehen aus zwei heterodimeren Glykoproteinketten, die meist durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Man unterscheidet

Alpha-, Beta-, Gamma- und Delta-Ketten. Im Blut findet man bei 85 – 98 % der T-Lymphozyten die $\alpha\beta$ -Kette exprimiert, bei 2 – 15 % die $\gamma\delta$ -Kette (13). Die T-Zell-Rezeptoren sind in der Zellmembran verankert.

Das TCR-Gen entsteht während der T-Zellreifung durch Umlagerung (Rearrangement) von Gensegmenten, die in der Keimbahn z.T. durch mehrere tausend Basen getrennt sind. Während der T-Zellreifung rearrangieren zuerst die Gene der γ - und δ -Kette, danach die der α - und β -Kette. Die δ -Kette liegt innerhalb des Keimbahnbereichs der α -Kette, weshalb die δ -Kette während des Rearrangements der α -Kette herausgeschnitten wird (27).

Die Keimbahnsequenz der TCR- α -Kette besteht aus 54 V- und 61 J-Segmenten (65,66), die der β -Kette aus 65 V-Sequenzen in 30 Subfamilien, 13 J- und 2 D-Sequenzen (94). Die TCR- γ -Gene verfügen über 11 funktionelle V-Regionen, die in 4 V γ -Subfamilien unterteilt sind (V γ I[V γ 1-8], V γ II[V γ 9], V γ III [V γ 10], und V γ IV[V γ 11]) und 5 J-Segmente. Der δ -Genbereich besitzt eine geringere Anzahl von 8 V-, 3D- und 4 J-Segmenten (65,66,34).

Die Verschiedenheit der Rezeptoren entsteht während des Rearrangements mittels der Verknüpfung von jeweils einem der V- und J- und bis zu 2 D-Gensegmenten (kombinatorische Diversität) und einer Veränderung der Sequenz zwischen den Gensegmenten (junktionale Diversität). Die kombinatorische Diversität ist aufgrund der Anzahl der Gensegmente bei der $\alpha\beta$ -Kette stärker ausgeprägt.

Die junktionale Diversität, bei der $\gamma\delta$ -Kette am grössten, entsteht dadurch, dass am Ende der V- und J-Segmente 1-2 Nukleotide abgetrennt und invers eingesetzt an die angrenzende Sequenz angehängt werden (palindrome P-Region), mit Hilfe der DNA-Polymerase TdT zufällig entstehende Nukleotid-Sequenzen (N-Region) eingesetzt und von den angrenzenden Sequenzen Nukleotide abgeschnitten werden (Deletion) (32).

Im Blut von gesunden Probanden findet man bei den TCR- γ -Genen N-Sequenzen von einer durchschnittlichen Länge von 4.6 (17), bei der β -Sequenz von 14-15 (94) und bei den TCR- δ -Genen von 22,1 Basenpaaren (18).

Da bestimmte Kombinationen bevorzugt rearrangiert werden (19), ist die Anzahl der Kombinationen in der Praxis kleiner als mathematisch möglich. Die Gensequenz des TCR wird als spezifisch für jeden T-Lymphozyten angesehen (33).

1.3.1.2 Southern-Blot

Erstes angewandtes Prinzip zur Bestimmung der Klonalität war der Southern-Blot. Aus den zu untersuchenden Zellen präparierte DNA wird mit Restriktionsendonukleasen verdaut und durch Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran (=Blotting) wird die DNA mit z.B. radioaktiv markierten Gensonden hybridisiert. Dadurch werden bestimmte Genabschnitte auf der Membran sichtbar gemacht. Üblicherweise werden zum Nachweis des TCR-Rearrangements Gensonden für die C β 1- oder C β 2-Region benutzt. Das Auswertungsprinzip beruht darauf, daß die TCR-Gene in der Keimbahnkonfiguration bei allen Individuen identische Schnittmuster zeigen und als definierte Linien im Blot erkennbar sind. Die rearrangierten Gene einer polyklonalen T-Zellinfiltration zeigen eine hohe Heterogenität der Restriktionsfragmente, so daß sie sich über den gesamten Trennbereich der Elektrophorese verteilen. Aus DNA klonal expandierter, genotypisch identischer T-Zellen entstehen große Mengen identischer Fragmente, die im Southern-Blot eine definierte Linie außerhalb der Keimbahn-Banden ergeben (43). Die Anwendung der Methode ist beschränkt, da DNA-Mengen im μ g-Bereich benötigt werden. Die methodische Sensitivität beträgt 3 – 5 %. In der Haut ist mittels Southern-Blot aufgrund der geringen Sensitivität eine Klonalität nur im Plaque- und Tumorstadium der Mycosis fungoides nachweisbar (72).

1.3.1.3 PCR

In der TCR-PCR werden von einem Kettentyp V-(D-)J-Rearrangements der in der Probe enthaltenen T-Zellen durch eine zyklisch wiederholte DNA-Synthese amplifiziert. Nach Spaltung der DNA in Einzelstränge durch Erhitzen wird mittels Anlagerung eines für das 3'- und 5'-Ende homologe DNA-Fragment (Primer) und der DNA-Polymerase neue DNA gebildet.

Für die Amplifikation eines spezifischen TCR-Gens muss ein für dieses spezifischer Primer entworfen werden. Nahezu alle kutanen T-Zell-Lymphome exprimieren TCR- $\alpha\beta$. Für das α -Gen gibt es aufgrund der großen Zahl und Heterogenität der Gensegmente keine universellen Primer für die V- bzw. J-Segmente (Konsensusprimer). Um alle möglichen TCR-Rearrangements zu erfassen, ist eine Vielzahl von Untersuchungsansätzen mit jeweils anderen Primern erforderlich.

Das TCR- β -Gensegment besteht nach der Nomenklatur von Rowen et al. (94) aus 65 V β -Gensegmenten, die in 30 Subfamilien unterteilt sind mit bis zu 75% Homologie

innerhalb der Familie. Viele Primersysteme beruhen auf Primern für die einzelnen Subfamilien (35). Kneba et al. (61) entwarfen stark degenerierte V- und J-Konsensusprimer, für die aufgrund zahlreicher Mismatches zur Erhöhung der Validität eine Southernblot-Analyse als Gegenprobe empfohlen wird.

Sowohl die γ - als auch die δ -Kette weisen nur wenige V- und J-Gensegmente mit konservativen Bereichen und eine hohe junktionale Diversität auf. Da jedoch das TCR- δ -Gen aufgrund seiner Lage innerhalb des α -Locus während dessen Rearrangement deletiert wird, ist es als Target ungeeignet.

Für die routinemäßige PCR bei kutanen T-Zell-Lymphomen empfiehlt sich daher das TCR- γ -Gen als Ziel-DNA. In den letzten Jahren wurden eine Reihe entsprechender Methoden entwickelt, die unterschiedliche Konsensusprimer für die TCR- γ -V- und -J-Segmente, aber auch Primermischungen von segmentspezifischen Primern nutzen. Die V γ -Segmente 1-8 werden bei gesunden Probanden zu 80% rearrangiert, die J γ - Segmente 1 und 2 zu 60% (13), weshalb eine PCR mit Primern spezifisch für V γ 1-8 und J γ 1/2 zwischen 60 und 80% der Rearrangements erkennen kann (17,34,45).

Zur Fraktionierung der PCR-Produkte ist eine Auftrennung zum Beispiel mittels Elektrophoreseverfahren notwendig. Dazu sind die Denaturierende- (DGGE) und die Thermogradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) geeignet. Sie trennen die Produkte nach Größe, Form und Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen auf. Polyklonale PCR-Produkte ergeben nach der Färbung eine breite, unscharf begrenzte Zone („Schmier“), klonale Anteile zeigen sich in diskreten Linien.

Die Sensitivität der PCR ist mit 1% etwas höher als beim Southern-Blot. Es kann in Formalin fixiertes Material verwendet werden (71,107).

1.3.1.4 Klon spezifische PCR

Die klon spezifische PCR für TCR- β und - γ basiert auf der Annahme der N-Region als spezifischen Fingerabdruck einer T-Zelle oder eines T-Zellklons (103,106,107).

Das monoklonale T-Zellrearrangement wird sequenziert und ein zur junktionalen Region homologes Oligonukleotid synthetisiert, welches als zweiter Primer in der klon spezifischen PCR eingesetzt werden. Der Primer bindet an DNA-Segmente mit gleicher N-Region, z.B. aus an anderer Stelle oder später entnommenen Blut- oder Gewebeproben. Die Sensitivität des Nachweises von klonaler DNA mit Hilfe klon spezifischer PCR beträgt 1 klonale in $10^5 - 10^6$ polyklonalen Zellen (103,106). Die

klonspezifische PCR wurde zum Monitoring maligner Zellen im Blut bei T-ALL-Patienten entwickelt. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode konnte damit auch in frühen Stadien der MF die klonale Sequenz nachgewiesen werden. Erstmals war es möglich, retrospektiv die klonale Sequenz in hypopigmentierten Läsionen, d.h. im Prä-MF-Stadium entnommenen Hautproben, zu detektieren (107).

1.3.1.4.1 Design eines klonspezifischen Primers

Die Effizienz eines PCR-Primers in der PCR wird durch seine Bindungseigenschaften bestimmt. Ein optimaler Primer bindet effizient an die Zielsequenz, geht aber keine unspezifischen Bindungen mit der restlichen DNA oder anderen Primern ein. Von besonderem Interesse beim Primerdesign ist das 3'Ende des Primers. Eine Verlängerung des Oligonukleotids durch die Taq-Polymerase findet nur dann statt, wenn das 3'Ende an ein einzelsträngiges DNA-Molekül gebunden ist.

Für die Stabilität der Bindung zwischen Primer und DNA-Fragment ist die dabei freiwerdende Energie entscheidend. Je höher die freiwerdende Energie bei einer chemischen Reaktion ist, umso stabiler ist die dabei eingegangene Bindung. Bei der Ausbildung der drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin wird mehr Energie frei als bei der Bildung der zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenosin und Thymin. Deshalb ist die Stabilität des DNA-Doppelstranges anhand des Prozentsatzes des vorhandenen Cytosins und Guanins zu bestimmen. Bereits bei Oligonukleotidlängen von 18 Basen kann eine ausreichend stabile Bindung des 3'Endes zur Extension führen unabhängig von den Bindungen im 5'Bereich. Ist also das 3'Ende eines Primers reich an Guanin und Cytosin, ist zwar die Effizienz des Primers hoch, es sinkt aber die Spezifität des Primers, da zur Extension nicht die vollständige Anlagerung notwendig ist. Primer mit einem hohen Anteil an Adenin und Thymin am 3'Ende haben andererseits eine höhere Spezifität, aber eine geringere Effizienz (20).

Wird die Primersequenz so gewählt, dass im 5'Bereich vermehrt Guanin und Cytosin und am 3'Ende vermehrt Adenin und Thymin vorhanden sind, erhält man ein Oligonukleotid mit hoher Spezifität und hoher Effizienz. Im 5'Bereich entsteht ein stabiler Doppelstrang, während die Bindung am 3'Ende weniger fest ist. Dadurch führen bereits einzelne Fehlbindungen im 3'Bereich zur Unterbindung der Extension, weil es, auch wenn die direkt 3' gelegene Base komplementär ist, nicht zur Anlagerung der

letztgenannten kommt. Treten jedoch im 3' Bereich keine Fehlbindungen auf, erhöht ein vollständig bindender 5' Bereich die Stabilität des Primer-DNA-Doppelstranges und garantiert eine effiziente Extension.

Des Weiteren ist die Schmelztemperaturdifferenz der in der PCR verwendeten Primer von Interesse. Eine grosse Differenz erschwert eine effiziente und spezifische PCR. Wird die Anlagerungstemperatur in den Bereich der höheren Schmelztemperatur des einen Primers gelegt, kann der andere Primer mit der niedrigeren Schmelztemperatur nicht in ausreichendem Masse binden. Im umgekehrten Fall kommt es neben der effizienten Anlagerung des Primers mit der niedrigeren Temperatur zu einer vermehrten unspezifischen Doppelstrangbildung des Primers mit der höheren Schmelztemperatur. Unspezifische Primerbindungen kann ein Primer eingehen mit der Ziel-DNA, einem anderen Oligonukleotid oder mit sich selbst. In den letztgenannten Fällen kommt es zur Bildung von Haarnadelstrukturen (s. Abb. 1) bzw. Primer-Dimern (s. Abb. 2). Ist dabei das 3'-Ende des Primers beteiligt, kommt es zur Extension und zur Bildung einer unspezifischen Sequenz, die nicht exponentiell, sondern linear abläuft. Eine Ausnahme tritt auf, wenn zwei unspezifische Bindungsstellen so nah aneinander liegen, dass sie innerhalb eines Extensionszyklus Strang und Gegenstrang bilden können. Dabei kommt es zum Verlust grosser Primermengen für die spezifische DNA-Amplifikation und zur exponentiellen Vervielfältigung eines unspezifischen Produktes. Ist das 3'-Ende des Primers nicht an der unspezifischen Anlagerung des Primers an die DNA beteiligt, steht der Primer nur bis zur Denaturierung im nächsten Zyklus nicht für die spezifische Bindung zur Verfügung (95).

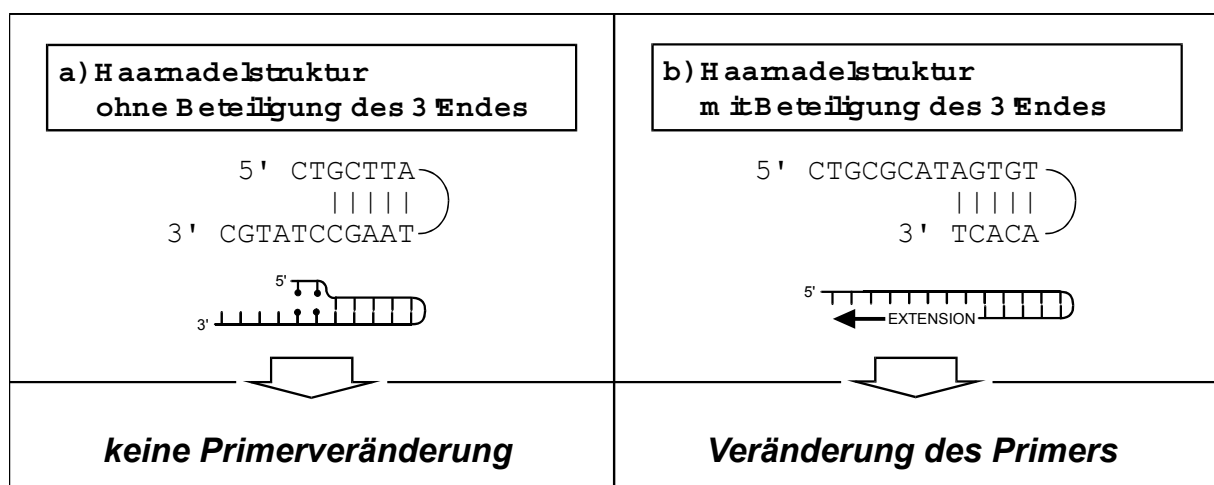


Abb. 1: Haarnadelstrukturbildung

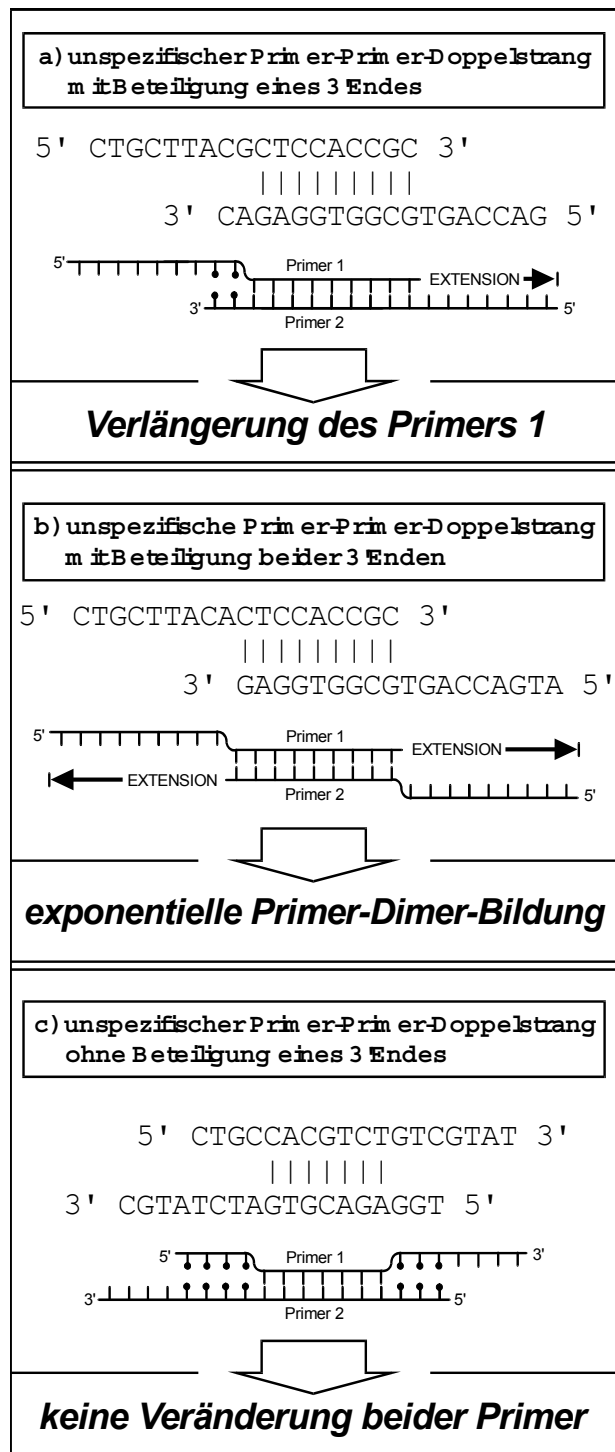


Abb. 2: Unspezifische Primerdoppelstrangbildung und deren Progression

1.3.1.4.2 Gelelektrophoreseverfahren

Mittels Elektrophorese werden die PCR-Produkte zur Charakterisierung der amplifizierten DNA mit Hilfe verschiedener Verfahren aufgetrennt. Ein Polyacrylamid-(PAGE) oder Agarosegel trennen das PCR-Produkt größenabhängig auf. DNA aus

einer polyklonalen Lymphozytenpopulation hat auf Grund verschiedener Rearrangements und N-Sequenzen leichte Unterschiede in der Länge und stellt sich im Gel als 'Schmier', DNA aus monoklonaler Population stellt sich aufgrund gleicher Länge als Bande dar.

Differenzen in der Nukleotidsequenz bewirken unterschiedliche Schmelztemperaturen von PCR-Produkten. Dies wird mittels einer denaturierenden, Harnstoff oder Formamid enthaltenden Lösung bei der DGGE (Denaturierenden-Gradienten-Gel-Elektrophorese) genutzt. Die Anlage eines denaturierenden Temperaturgradienten zwischen den Elektroden ist eine alternative Möglichkeit (Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese, TGGE). Erreicht das PCR-Produkt im Gel eine bestimmte Konzentration der denaturierenden Substanz oder Höhe der Temperatur, geht die doppelsträngige DNA in einen teilweise geschmolzenen Zustand über, was die Beweglichkeit herabsetzt und eine Auftrennung der DNA nach Schmelztemperatur bewirkt. Da die Schmelztemperatur sequenzabhängig ist, ist die Position der Bande einer monoklonalen DNA in der DGGE und TGGE ebenfalls sequenzabhängig.

Einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle zeigen abhängig von der Nukleotidsequenz eine intramolekulare Faltung (Sekundärstruktur, engl. *conformation*), welche die Mobilität in einem nicht-denaturierenden Gel beeinflusst (cRNA- oder DNA-*single-stranded conformational polymorphisms* [cRNA- bzw. DNA-SSCP]). Wird zum Beispiel monoklonale DNA mit Hilfe eines PAGE aufgetrennt, wird ein Muster von Banden sichtbar, das charakteristisch für die Sequenz ist. Da die Methode sehr arbeitsaufwendig ist, wird sie selten eingesetzt (41).

Trennt man auf einem Polyacrylamidgel mit fluoreszenzmarkierten Primern markierte DNA der Länge nach auf und werden die Fluoreszenzsignale während der Elektrophorese in einem DNA-Sequenzier erfasst, ergibt monoklonale DNA aufgrund der gleichen Länge einen einzigen Peak, aufgrund verschiedener Länge oligoklonale Rearrangements mehrere Peaks. Mittels der GeneScan-Analyse genannten Methode können Längenunterschiede von einer Base unterschieden werden. Setzt man die Fläche unter der monoklonalen Kurve in Bezug zur Gesamtfläche, ist eine relative Quantifikation der klonalen DNA in eingeschränkten Fällen möglich. Die Sensitivität dieser Methode liegt zwischen 0,1 und 1% (28,71,98).

1.3.1.4.3 Quantitative PCR im LightCycler®

In den letzten Jahren kam mit dem LightCycler® ein neues Verfahren der Firma Roche auf den Markt. Das Prinzip des Lightcyclers ist dem eines herkömmlichen Thermocyclers ähnlich. Durch Einsatz eines Farbstoffs ist darüber hinaus die Bestimmung der PCR-Produktmenge nach jedem Zyklus und damit neben der Messung der Endmenge des Produkts auch ein Monitoring der Kinetik der DNA-Amplifikation möglich. Neben dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist der Einsatz von für die Ziel-DNA spezifischen, mit einem Farbstoff gelabelten Hybridisationsproben möglich, wobei ein Fluoreszenzsignal entsteht, wenn sich beide Proben nebeneinander an der Ziel-DNA anlagern. Die TaqMan®-Probe der Firma Applied Biosystems ist mit einem Fluoreszein- und einem Quencher markiert und lagert sich an der DNA zwischen den beiden Primern an. Das Fluoreszenzsignal entsteht durch Hydrolyse des Fluoreszenzfarbstoffs aufgrund der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase während der PCR (87).

Die PCR-Ansätze werden in einzelnen Kapillaren eingesetzt, das Fluoreszenzsignal, welches in jeder Kapillare erzeugt wird, wird gemessen.

Der Ablauf der PCR im LightCycler lässt sich in drei Phasen unterteilen: Der *background noise*-Phase, welche andauert, bis das Fluoreszenzsignal des PCR-Produkts die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, folgt die *log-linear*-Phase, in der die Produktmenge exponentiell anwächst. Abschliessend geht die PCR in die Plateauphase über.

In demselben PCR-Lauf wird mit der Ziel-DNA in einer anderen Kapillare ein externer Standard mit bekannter DNA-Menge in einer Verdünnungsreihe eingesetzt.

Zum Vergleich der Amplifikationskurven der Ziel- und Standard-DNA wurde der Begriff des Crossingpoint C_p eingeführt. Der C_p ist charakteristisch für die Amplifikationskurve und bezeichnet eine imaginäre Zyklenzahl, die durch weiter unten beschriebene Methoden festgelegt wird.

Setzt man die Produktmenge am Crossingpoint als K und die Zyklenzahl am Crossingpoint als C_p (T_0 gleich Ausgangsmenge und E =Effizienz),

$$\text{ist } K = T_0 \cdot (E)^{C_p}$$

oder umgeformt $C_p = -(1/\log E) \cdot \log T_0 + (\log K / \log E)$, was als Gleichung für eine Standardkurve genutzt werden kann. Werden Standard- und Ziel-DNA mit der gleichen

Effizienz amplifiziert, kann vom Crossingpoint der Amplifikationskurve der Ziel-DNA mit Hilfe der Standardkurve auf die Menge der unbekannt DNA geschlossen werden.

Zur Bestimmung des Crossingpoints blendet man Hintergrundsignal und Plateauphase aus, es bleibt der nahezu lineare Teil der Amplifikationskurve. Mit Hilfe der *fit points*-Methode wird zwischen mindestens 2 darauf liegenden Punkten eine Gerade gelegt. Der Crossingpoint ergibt sich aus der Kreuzung dieser Geraden mit einem vom Untersucher festzulegenden Schwellenwert.

Eine untersucherunabhängige Methode setzt das Maximum der 2. Ableitung als charakteristischen Punkt der Amplifikationskurve. Diese *second derivate maximum*-Methode nimmt alleine die Form der Amplifikationskurve als Grundlage zur Bestimmung des *Crossingpoints* (87).

Die weitere Analyse der PCR-Produkte ist mit Hilfe der Schmelzkurve der DNA möglich, wobei die Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Temperatur in Beziehung gesetzt wird. Mit zunehmender Temperatur nimmt der Anteil der doppelsträngigen DNA eines PCR-Produkts und damit das Signal ab, es fällt stark, wenn die Temperatur die Schmelztemperatur T_m überschreitet. In der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenzsignale $-dF/dT$ ergibt sich bei T_m ein Peak.

Da die Schmelztemperatur sequenzabhängig ist, können mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse unbekannte von bekannter DNA oder spezifische von unspezifischen PCR-Produkten differenziert werden (91).

1.3.2 Genotypisierung und Sequenzierung

1.3.2.1 Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen in der Haut

Mittels Southern-Blot wurden erstmals monoklonale Zellen in auffälligen Hautbiopsaten von MF-Patienten nachgewiesen. Aufgrund der Notwendigkeit einer suffizienten DNA-Menge im μg -Bereich und einer Sensitivität von 3-5 % waren positive Ergebnisse erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien möglich (72). Die Sensitivität der PCR in Verbindung mit DGGE oder TGGE ist um den Faktor 2-3 höher. Muche et al. (75) untersuchten mit Hilfe der von Volkenandt entworfenen TCR- γ -Konsensusprimer und TGGE die Hautproben von 67 MF-Patienten. Bei polyklonalem Ergebnis in der Konsensus-PCR wurde eine für TCR- γ -II-IV spezifische Multiplex-PCR durchgeführt. Damit konnte bei 66% bzw. 76% der Hautproben von Patienten im Stadium Ia bzw. Ib,

im Stadium IIa bei 2/2, im Tumorstadium bei 3/4 Patienten ein monoklonales Infiltrat nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse mit Hilfe von PCR und DGGE sind ähnlich (s.Tab. 3). Delfau-Larue et al. (28) eruierten bei 9/13 (69%) MF-Patienten im limitierten Stadium ein monoklonales Ergebnis im Hautbiopsat, bei 3/3 Patienten im Tumorstadium.

Tab. 3: In Hautbiopsaten von MF-Patienten mittels TCR- γ -PCR und TGGE (75) bzw. DGGE (28) gefundene Monoklonalität in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

MF-Stadium	Monoklonalität	Monoklonalität
	TCR- γ -PCR/TGGE	TCR- γ -PCR / DGGE
IA	66% (12/18)	80% (3/5)
IB	76% (31/41)	100% (1/1)
IIA	100% (2/2)	71% (5/7)
IA – IIA	74%	69%
>IIA	75% (3/4)	100% (1/1)

Diese Zahlen zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit des Nachweises monoklonaler Zellen in Hautbiopsaten von MF-Patienten abhängig vom Krankheitsstadium steigt. Mit Hilfe klonspezifischer PCR waren monoklonale Zellen auch in Prä-MF-Stadien nachweisbar (107). Deshalb liegt der Schluss nahe, dass der Nachweis klonalen Zellen in Hautläsionen von MF-Patienten von der Sensitivität der Methode abhängt.

1.3.2.2 Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen im Blut

Da für den Nachweis von klonalen Zellen mittels Southern-Blot eine vergleichsweise hohe Anzahl von klonalen Zellen notwendig ist, ist dies im Blut von Patienten in frühen MF-Stadien selten möglich. In Blutproben von 63 MF-Patienten konnte stadienunabhängig nur bei 8 monoklonale Zellen gezeigt werden, bei 6% in Frühstadien der Erkrankung (41).

Muche et al. (75) konnten mittels TCR- γ -PCR und TGGE in 61% der im MF-Stadium I entnommenen Blutproben monoklonale, zirkulierende Zellen eruiieren. Unter Verwendung einer SSCP-PAGE als Elektrophoreseverfahren wurde bei 33% von in Frühstadien (Stadium IA bis IIA) entnommenen Blutproben Monoklonalität nachgewiesen (41). Hier zeigte sich die Tendenz eines häufigeren Nachweises

monoklonaler Zellen im Blut in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums. In der Studie von Muche et al. (75) war aufgrund der niedrigen Fallzahl keine statistische Aussage dazu möglich (s.Tab. 4). Untersuchungen zum Nachweis zirkulierender, klonaler Zellen mittels klonspezifischer PCR gibt es bisher nicht.

Tab. 4: In Blutproben von MF-Patienten mittels TCR- γ -PCR und TGGE (75) bzw. SSCP-PAGE (41) gefundene monoklonale Ergebnisse in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

MF-Stadium	Monoklonalität TCR- γ -PCR / TGGE	Monoklonalität TCR- γ - PCR / SSCP-PAGE
IA	61% (11/18)	17% (2/12)
IB	61% (25/41)	29% (4/14)
IIA	100% (2/2)	71% (5/7)
IA - IIA	62%	69%
>IIA	25% (1/4)	64% (21/33)

1.3.2.3 Prognostische Relevanz des Nachweises monoklonaler Zellen im Blut vom MF-Patienten

Die Relevanz des Nachweises monoklonaler Zellen im Blut von MF-Patienten wird kontrovers diskutiert. Aufgrund der *skin homing*-Natur zirkulieren die bei MF maligne wachsenden Zellen von der Haut über die Lymphknoten in die Blutbahn und zurück. Hinweise darauf gibt das Auftreten von Krankheitserscheinungen an verschiedenen Lokalisationen schon in Frühstadien der Erkrankung. Ob es sich also bei den im Blut nachgewiesenen Zellen um einen Blutbefall oder lediglich um den Nachweis der *skin homing*-Zellen handelt, ist umstritten.

Im Blut von MF-Patienten wurden, abhängig vom Krankheitsstadium, bei 17-61% monoklonale Zellen nachgewiesen. Bei Kontrollen gesunder Probanden oder von Patienten mit benignen Dermatosen war dies nicht möglich (41,79). Auf der anderen Seite berichten mehrere Autoren über den Nachweis von monoklonalen $\nu\beta$ -Rearrangements auch bei den zuletzt genannten Probandengruppen und Patienten mit Autoimmunerkrankungen (31,74,84,100). Der Nachweis dieser Klone hängt ab vom Alter, häufiger werden CD8-positive Klone gefunden.

Diese Ergebnisse stellen die Bedeutung des Nachweises monoklonaler Zellen ausschliesslich im Blut von MF-Patienten in Frage. Delfau-Larue et al. (29) konnten bei

40/88 MF-Patienten zirkulierende klonale Zellen nachweisen, jedoch nur bei 11 von 40 Patienten konnte ein identischer Klon in Haut- und Blutproben gezeigt werden. Im Gegensatz dazu stehen andere Studien (74,29), die bei 25/26 bzw. 19/19 monoklonalen Blutproben den identischen Klon auch in der Haut nachweisen konnten.

Bezüglich der Bedeutung des Nachweises zirkulierender, klonaler Zellen für den Krankheitsverlauf zeigten Bakels et al. (9) mittels Southern-Blots einen Zusammenhang zwischen monoklonalem Ergebnis und Prognose. Frazer-Andrews und seine Kollegen (41) setzten die Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben von 63 MF-Patienten mittels PCR-SSCP-Assay in Beziehung zur Überlebenszeit und konnten für T1- und T2-Stadien eine um 30% verringerte 10-Jahres-Überlebensrate bei Nachweis zirkulierender, klonaler Zellen finden. Beylot-Barry et al. (12) kamen mittels PCR und DGGE zu ähnlichen Ergebnissen. Muche et al. (75) dagegen konnten diesen Zusammenhang durch die Untersuchung von 67 MF-Patienten mittels PCR und TGGE nicht bestätigen. In einer anderen Arbeit dieser Arbeitsgruppe (74) wurde der Nachweis identischer Klone in Blut- und Hautproben mittels PCR und Fluoreszenz-Fragment-Analyse nur zusammen mit einem Patientenalter grösser 60 Jahre als prognostische Faktoren für einen Progress im TNM-Stadium identifiziert. Der Nachweis zirkulierender klonaler Zellen im Blut war dagegen bei MF-Patienten jünger als 60 Jahre irrelevant.

Aufgrund der *skin homing*-Natur der bei MF maligne entarteten Zellen liegt auf der anderen Seite der Schluss nahe, dass der Nachweis zirkulierender, klonaler Zellen nicht eine Frage der Blutpräsenz sondern der Sensitivität der Methode ist. Mit der klonpezifischen PCR steht eine neue Methode mit einer Sensitivität von ca. $1:10^5$ zur Verfügung. Wir stellen uns die Frage, ob die Menge zirkulierender, klonaler Zellen im Blut von MF-Patienten im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf steht. Vorbild dafür war der Begriff der *Minimal residual disease*, welcher in der Therapie von ALL- (akute Lymphoblasten-Leukämie-)Patienten geprägt wurde. Hier wurde gezeigt, dass die malignen Zellen durch Therapie nicht vollständig eradiziert werden und die Quantifizierung der klonalen Zellen in Blut und Knochenmark mittels klonspezifischer Primer im Verlauf einen Hinweis auf den Krankheitsverlauf und die Prognose dieser Patienten geben (103,34).

Verlaufsuntersuchungen, die die Frequenz zirkulierender, klonaler Zellen bei MF-Patienten untersucht haben und sie in Zusammenhang mit Klinik und Therapie gesetzt haben, liegen bisher nicht vor. Es stellt sich die Frage, ob die Frequenz klonaler Zellen im Blut mit dem Krankheitsverlauf in Zusammenhang steht.

1.4 Fragestellung

Untersuchungen bei MF-Patienten

Gegenstand des ersten Teils der Arbeit ist die Etablierung einer molekularbiologischen Methode zur quantitativen Analyse von klonalen T-Zellen in Blutproben von MF-Patienten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf gesetzt werden.

1. Ist es möglich, klonspezifische PCR-Primer zu entwickeln und mit deren Hilfe in Haut- und in Blutproben klonale Zellen nachzuweisen? Die Sensitivität dieser Methode soll mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bestimmt werden, die Spezifität durch Einsatz von DNA mit bekannter TCR-Sequenz in die klonspezifische PCR.
2. Mit der LightCycler- (*Real time*-) PCR steht eine schnelle Methode zur Quantifizierung zur Verfügung. Ist es möglich, die klonspezifische PCR mittels SYBR-Green als Methode zur Quantifizierung klonaler Zellen zu etablieren? Dazu sollen Untersuchungen zur Effizienz der Primer in der Amplifikation von Standard- und Ziel-DNA durchgeführt werden. Mittels der quantitativen, klonspezifischen PCR sollen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommene Blutproben untersucht werden.
3. Wie variiert der Anteil zirkulierender, klonaler Zellen im Verlauf der Erkrankung?
4. Von den Patienten wurden Daten zum Krankheitsverlauf und zur Therapie erfasst. Die Ergebnisse der Quantifizierung zirkulierender, klonaler Zellen im Verlauf soll zum klinischen Krankheitsverlauf in Beziehung gesetzt werden. Gibt es eine Korrelation zwischen der Menge der klonalen Zellen im Blut und der Klinik der Erkrankung? Welche Schlussfolgerungen können daraus auf die Pathophysiologie, aber auch auf die Therapie der Erkrankung gezogen werden?

Untersuchungen bei SPP-Patienten

Über den Krankheitsverlauf der SPP existieren unterschiedliche Daten in der Literatur. Im zweiten Teil der Arbeit soll die Frage nach der Einordnung der SPP als benigne Erkrankung oder als Vorstufe der MF untersucht werden. Es stellt sich die Frage, ob die molekularbiologische Untersuchung von Haut- und Blutproben Hinweise auf die Dignität dieser Erkrankung liefern kann.

1. Bei der PCR-Untersuchung von Proben von SPP-Patienten fielen monoklonale Ergebnisse in den Blutproben auf. Wie gross ist der Anteil der SPP-Fälle, in deren Blut monoklonale T-Zellen nachgewiesen werden können? Gibt es Besonderheiten beim Rearrangement dieser Zellen? Mittels Sortierung in CD4- und CD8-positive Zellen mittels Flowzytometrie soll geklärt werden, ob es sich dabei um reaktive oder maligne Zellen handelt.
2. Nach Sequenzierung der klonalen TCR-Sequenz sollen klonspezifische Primer entwickelt werden. Bisher wurden in der Haut mittels Konsensusprimer-PCR im Gegensatz zu anderen Autoren keine klonalen Rearrangements nachgewiesen. Ist es möglich, mittels klonspezifischer PCR die klonalen Sequenzen aus dem Blut in den Hautproben nachzuweisen?
3. Welche Schlussfolgerungen lassen die molekularbiologischen Ergebnisse für die Einordnung der SPP zu?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten MF / SPP

Es wurden Haut- und Blutproben von zwei Patientengruppen als Untersuchungsmaterial verwendet:

Gruppe 1: Zwischen 1997 und 2001 wurden von MF-Patienten aus der Dermatologischen Klinik der Charité, Berlin, Krankheitsverlauf und Therapie dokumentiert; es wurden pro Patient bis zu 18 Blutproben (PBMC) und zeitgleich oder getrennt Hautbiopsate entnommen. Einschlusskriterien für die Patienten waren, dass die Diagnose MF histologisch gesichert und klinisch mit großer Wahrscheinlichkeit oder mit Sicherheit gestellt werden konnte und dass die Patienten in der TCR- γ - oder TCR- β -PCR mindestens eine monoklonale Hautprobe aufwiesen. Ausschlusskriterien waren eine gleichzeitige Erkrankung an angioimmunoblastischer Lymphadenopathie oder anderen lymphoproliferativen Erkrankungen, außerdem waren posttransplantäre und immundefiziente Patienten ausgeschlossen.

Gruppe 2: Zwischen 1996 und 1999 wurden bei Erstdiagnose zeitgleich von 14 SPP-Patienten Hautbiopsate und Blutproben entnommen, Krankheitsverlauf und Therapie wurden dokumentiert. Einschlusskriterien waren, dass die Patienten sowohl histologisch als auch klinisch die Diagnosekriterien für eine Small Plaque Psoriasis erfüllten. Diagnosekriterien für SPP waren das Auftreten ovaler, leicht schuppiger und atrophischer Flecken mit grosser Monomorphie und mit einem Durchmesser von weniger als 5 cm am lateralen Oberkörper oder auf den Innenseiten von Armen und Beinen zusammen mit dem histologischen Nachweis bandartiger, lymphohistiozytärer Infiltrate in der oberen Dermis, epidermaler Spongiose, einer geringen Anzahl von epidermotropen Zellen und die Abwesenheit von Pautrier'schen Mikroabszessen und atypischen Zellen. Die Ausschlusskriterien waren mit Gruppe 1 identisch.

Als Negativkontrolle wurden PBMC von gesunden Probanden, als Positivkontrolle Zellen aus der monoklonalen Jurkat-Zelllinie verwendet.

2.2 Material

- Schüttelwasserbad 1083, GFL
- Metallblock-Thermostat DB 2P, thermo-DUX
- Zentrifuge C 422, Jouan
- Tischzentrifuge, Eppendorf
- Zählkammer, Neubauer, Deutschland
- Thermocycler Varius V, Landgraf
- Macro Drive 1 Power Supply 2301, LKB
- Agarosegelsystem, Micro Bio Tec Brand
- Kälte-Umwälzthermostat F10-MH, Julabo
- TGGE-System, Diagen
- 373-A ABI DNA-Sequenzer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- LightCycler II, Roche Diagnostics
- Midi-Macs, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland

2.2.1 Chemikalien

- Xylol: J.T. Baker, Deventer Niederlande
- Ficoll-HyPaque: Pharmacia, Freiburg, Germany
- PBS: 1,7mM NaCl; 0,064mM KCl; 0,375% Tris-Base; 0,002% Phenolrot; pH 7,4
- MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (pH 7,0); 50mM Natriumacetat; 5mM EDTA, pH 8,0
- TBE: 89mM Tris-Base; 89mM Borsäure; 2mM EDTA; pH 8,0
- Extraktionspuffer: 50mM KCl; 10mM Tris/HCl; 0,45% nonidet-P40; 0,45% Tween20; pH 8,3
- Proteinase K: Boehringer Mannheim, Germany
- Ladepuffer (10x): 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylenxyanol; 15% Ficoll
- DNA-Längen-Standard: Hinc III Lambda -DNA: Bethesda Research Laboratories, Lifetechnologie, Inc., Bethesda, USA, Cat.-Nr. 5612SA
- PCR-Puffer: Applied Biosystems, Kat.-Nr. N808 0153

- MgCl₂ (PCR): Applied Biosystems, Kat.-Nr. 4311814
- Taq Polymerase: Perkin Elmer, Kat.-Nr. N 801-0060
- dNTP: Pharmacia, Freiburg, Germany
- 2% Agarose: 2% Agarose in 1x TBE-Puffer; 0,5µg/µl Ethidiumbromid, Polyacrylamidgel: 8% Polyacrylamid in 1x MOPS-Puffer; 8M Harnstoff; 0,05% Glycerin; 0,06% Ammoniumpersulfat; 0,06% TEMED
- Jurkat-Zelllinie
- Sequenzierkit: Taq-Polymerase FS, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- Na-Acetat 3M: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Formamid: Merck, Darmstadt, Deutschland
- EDTA: Bio Whittaker, Maryland, USA
- TA Cloning Kit, Invitrogen, Lot: 601728
- LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics, Kat-No. 2239 264
- Hot-Start-Taq-Polymerase: Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Kat.Nr.: 431 1814
- QIAquick PCR purification Kit: Qiagen, Hilden, Germany
- High Pure PCR Template Preparation Kit: Roche Molecular Biochemicals, Kat. No. 1 796 828
- High Pure PCR Product Purification Kit: Roche Molecular Biochemicals, Kat. No. 1732668
- CD4+/CD8+ T Cell Isolation Kit: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany

2.2.2 Software

- OLIGO 5.0 Primer Analysis Software for Windows, National Biosciences, Inc., USA
- Data Collection-Software: Applied Biosystems
- Software Wincam Version 2.2 (Serial: MA 21 464 3312)
- LightCycler-Software, Roche Molecular Biochemicals, Version 3.5
- NCBI Database (82)

2.3 Genotypisierung

2.3.1 DNA-Isolation

Von in Paraffin konserviertem Gewebe (Hautbiopsat) wurden 10 Schnitte (zu jeweils 10 µm) angefertigt. Mittels zweimaligen Waschens in 1 ml Xylol, gefolgt von 1 ml Ethanol (96%ig) wurden die Biopate deparaffinisiert. Nach Trocknen im Vakuum wurde die DNA wie unten beschrieben isoliert.

Aus 20 ml heparinisiertem Blut wurden PBMC mittels Zentrifugation (20 min bei 2400 U/min) durch einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Nach der Reinigung der abgetrennten Zellen durch zweimalige Zentrifugation (10 min, 1800 U/min) in PBS und Verwerfen des Überstands wurde das Zellsediment in 200 µl PBS gelöst und der DNA-Präparation zugeführt.

Die als klonale Positivkontrolle verwendeten Zellen aus der Jurkat-Zelllinie wurden abzentrifugiert und durch zweimalige Zentrifugation (10 min, 1800 U/min) in PBS gereinigt. Nach Bestimmen der Zellzahl in einer Zählkammer wurden 10^7 Zellen wie unten beschrieben weiterverarbeitet.

PBMC der SPP-Patienten wurden einer Auftrennung der T-Zellen nach CD4- bzw. CD8-Zellmarkern mit Hilfe des CD4+ bzw. CD8+ T cell Isolation Kits unterzogen. Nach Suspension in 80µl Puffer/ 10^7 Zellen wurde die Mischung mit 20µl Hapten-Antikörper-Cocktail für 10 min bei 6-12°C inkubiert und anschliessend zweimal mit Puffer mittels Zentrifugation für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Auf die Zugabe von 20µl MACS Anti-Hapten Microbeads folgten eine weitere 15-minütige Inkubation bei 6°C und eine Waschung. Mit 500µl Puffer gemischt wurde die Zellsuspension in die sogenannte LS+/VS+-Säule des Midi-Macs gegeben. Nach Anlage des Magnetfeldes wurden die magnetisch nicht markierten Zellen getrennt und konnten als CD4- bzw. CD8-angereicherte Fraktion gesammelt werden. Nach Extraktion der DNA wurde diese mit den patientenspezifischen Primern der SPP-Patienten nochmals in einer klonspezifischen PCR eingesetzt.

Die aus Blut gewonnenen Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), das deparaffinierte Gewebe und die gewaschenen Jurkat-Zellen wurden jeweils nach Aufnahme in Extraktionspuffer, unter Zusatz von 40 µg Proteinase K, 16 Stunden bei

55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch thermische Denaturierung (15 min bei 95 °C). 5 µl des Ansatzes, d.h. etwa 250µg DNA, wurden in der PCR eingesetzt.

2.3.2 TCR-β-PCR

Es wurden zwei PCR-Runden durchgeführt. In der ersten wurde Vb cons mit einer Mischung aus Jb I (2) und Jb II(2), in der zweiten 2 Vol% aus der ersten Runde mit den Primern Vb cons und Jb I(1) und Jb II(1) eingesetzt (Primer s.Tab. 5, S.12) (61,67). Die PCR-Bedingungen waren 1 Minute Denaturierung bei 92°C, 40 Sekunden Annealing bei 50°C und 30 Sekunden Extension bei 72°C für 40 Zyklen. Die erste Denaturierung und die letzte Extension wurden auf 5 Minuten ausgedehnt. Die Produktlänge betrug zwischen 240 und 290 Basenpaaren. Im PCR-Ansatz waren die Primer jeweils in einer Konzentration von 0,5 µM, MgCl₂ von 2,5 bis 4mM und 2,1 µl eines Stammansatzes enthalten.

2.3.3 TCR-γ-PCR

Die TCR-γ-PCR wurde in 3 verschiedenen Reaktionsansätzen durchgeführt. Primerbindungsstellen und Sequenzen (80,106) sind in Tab. 5 dargestellt. Die PCR-Produktlänge betrug ca. 260 Basenpaare:

TCR-γ-1-PCR

Primer: V g cons und J g cons

In den Reaktionsgemischen (75µl) enthalten waren Promega-PCR-Puffer, in Endkonzentration 4 mM MgCl₂ , 200 µM je dNTP, 0,67 µM je Primer, 3 U Taq Polymerase und 5 µl, d.h. 0,2 bis 0,5 µg der isolierten DNA. Initial wurde jedes Gemisch im Thermocycler 5 min bei 95 °C denaturiert, gefolgt von 40 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 93 °C, 1 min Anlagerung (*annealing*) bei 58 °C und 1 min Extension bei 72 °C. Abschließend wurde 4 min eine Extension bei 72 °C durchgeführt.

TCR-γ-2-PCR

Primer: Vg 2, VG 9 und J cons

Hier enthielten die Reaktionsgemische (75 µl) Promega-PCR-Puffer, in der Endkonzentration 2,5 mM MgCl₂, 200 µM je dNTP, 0,5 µM je Primer, 2 U Taq Polymerase und 5 µl DNA.

Die Reaktionsbedingungen waren mit denen der TCR-γ-1-PCR identisch.

TCR-γ-3-PCR

Primer: Vg cons, Vg 2, Vg9 und JgP 1/2

Die Reaktionsgemische sowie die PCR-Bedingungen entsprachen der TCR-γ-2-PCR.

Tab. 5: Primer, Spezifität und Sequenzen (Quelle der Primersequenzen in Klammern)

Primer	Quelle	Spezifität für	Sequenz (5' => 3')
Jg P 1/2	(80)	JGP 1 u. JGP 2	CTTGAGCYTAGCCCTT
Jg 12 MM	(80)	JG 1 u. JG 2	TgTTgTTCCACTgCCAAA
Jg cons	(107)	JG 1 u. JG 2	CAACAAgTgTTgTTCCAC
Vg 18 MM	(80)	VG 1-8	GgTCATCWgCTgWAATCAC
Vg 2	(80)	VG 10, 11, A und B	CACTggTACKKgCAgAAAC
Vg 9	(80)		ATTggTATCgAgAgAgAC
Vg cons	(107)	VG 1-8	CTACATCCACTggTACCT
Vg seq		VG 1-8	AGRCCCCACAGCATCTTC
Vg 9T			ggAAAggAATCTggCATTCCg
Vg 10T			CACTggTACCggCAgAAACTCC
Vg 11T			gCTCAAgATTgCTCAggTggg
JbI-1	(61)		WgAgYCIRgTYCCIIIIICAAA
JbI-2	(61)		ACIgWgAgYCIRgTYCC
JbII-1	(61)		TSAgCCKIgTgCCIgSICCgAA
JbII-2	(61)		ACIgTSAgCCKIgTgCC
Vb cons	(67)		TgTAYCTCTgTgCCAgCAg
Vb 1			gCTCCCCTAggTCTggAgACCTCTCT
Vb 10			gAAgAAgAgCTCAAgTTTTTggTTTACTTT
Vb 11			TgATATCACCTCATCCACTATTCCTATgg A
Vb 12			gACAgAggATTCCTCCTCACT

Primer	Quelle	Spezifität für	Sequenz (5'=> 3')
Vb 13			CACTgCggTgTACCCAggATATgA
Vb 14			gggCTCggCTTAAggCAgACCTAC
Vb 15			ggCCTACggTTgATCTATTACTCCTT
Vb 16			TgTgACCCAATTTCTggACATgATAAT
Vb 17			gAACAgAATTTgAACCCAgATgCC
Vb 18			AgCCCAATgAAAaggACACAgTCAT
Vb 19			ACCCCCgAAAAaggACATACTTTT
Vb 2			CCACATACgAgCAAaggCgTCgA
Vb 20			gAgggAACATCAAACCCCAACCTA
Vb 21			gATTCACAgTTgCCTAAaggA
Vb 22			gTCCCCATCTCTAATCACTTATACT
Vb 23			TCCAggTCAggACCCCCAgTT
Vb 24			TggTACCAgCAgAAgTCAAgT
Vb 3			TCCAggATATggACCATgAAAATATgTTC
Vb 4			CAACCTggACAgAgCCTgACA
Vb 5			CTgATCAAAACgAgAggACAgCA
Vb 6			CAggTgCTggAgTCTCCCAg
Vb 7			ACCggAgCTCATgTTTgTCTACA
Vb 8			TCTggTACAgACAgACCATgAT
Vb 9			ACCTAAATCTCCAgACAAAgCT

2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Das Überprüfen einer erfolgreichen Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels im Agarosegelsystem (Micro Bio Tec Brand). 8 µl des PCR-Produktes wurden nach Zusatz von 2 µl Ladepuffer aufgetragen und in 1 x TBE-Puffer bei 60 V eine Stunde aufgetrennt. Als Produktlängenmarker wurde Hinc III-Lambda-Größenstandard eingesetzt.

In der Agarose darstellbare PCR-Produkte wurden mittels TGGE analysiert.

2.3.5 TGGE

7 µl PCR-Produkt und 2 µl Ladepuffer wurden in einer Temperaturgradientenelektrophorese aufgetrennt. Die Separation erfolgte in einem 1 mm starken Polyacrylamidgel mit einem Gradienten von 33 °C bis 55 °C bei 300 V und 2:40 h Laufzeit im TGGE-System von Diagen (86).

Die Gele wurden zweimal je 3 min in 10 % Ethanol und 0,5 % Essigsäure fixiert, danach 10 min mit 0,1%iger Silbernitratlösung gefärbt und 25 min in 1,5 % Natriumhydroxid, 0,01% Natriumborhydrit, 0,15% Formaldehyd entwickelt. Nach 5 min Behandlung in 0,75% Natriumcarbonat konnten sie getrocknet, in Folien konserviert und fotografiert werden. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Gele mit Aqua bidest. gewaschen (86).

2.3.6 Sequenzierung

Von den SPP-Patienten wurden die Blutproben mit monoklonalen TCR-γ-Rearrangements, von den MF-Patienten die diagnostischen Hautbiopate, die ein monoklonales Ergebnis der TCR-γ- oder -β-PCR gezeigt hatten, zur Sequenzierung weiterverarbeitet.

Zum Vorbereiten der Sequenzierung wurden die monoklonalen Banden aus dem TGGE-Gel ausgeschnitten und das entsprechende Polyacrylamidstück über Nacht in 30 µl 1x-PCR-Puffer inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 2 bzw. 4 µl des Überstandes in einer Re-PCR eingesetzt, bei der die Konzentration der Reagenzien und die PCR-Bedingungen mit denen des ersten PCR-Schrittes übereinstimmten.

Rearrangierte TCR-β-DNA wurde mit den Primern Vb cons und Jb1-1 und Jb II-1 amplifiziert (61). Bei Proben, die ein monoklonales Ergebnis in der TCR-γ-1-PCR zeigten, wurde Vg seq und Jg cons als Primer eingesetzt, bei Proben mit monoklonalem Ergebnis in TCR-γ-2- bzw. -3-PCR Vg 9T, Vg 10T oder Vg 11T mit Jg cons bzw. Jg P 1/2.

Das oben gewonnene PCR-Produkt wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt und 3 – 6 µl davon in einem Reaktionsgemisch aus 5 µl Premix und 1,5 µl von einem der beiden in der Re-PCR verwendeten Primer, 1 : 12 verdünnt, eingesetzt. Mit Aqua dest. wurde auf 20 µl aufgefüllt. Initial wurde jedes Gemisch 30 s bei 96 C denaturiert, gefolgt von 25 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 96 C, 15 s Anlagerung bei 50 C und 4 min Extension bei 60 C.

Nachdem die mit 2 µl 3M Na-Acetat und 50 µl 95 %igen Ethanol gemischte Probe 10 min auf Eis inkubiert und 20 min zentrifugiert worden war, wurde das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und nach Zugabe von 4 µl einer Mischung aus Formamid, EDTA und Dextran-Blau im Verhältnis 5:1:1 zwei Minuten bei 90°C denaturiert.

Die Probe wurde auf einem 4,75 %igen Polyacrylamidgel in 1 x TBE bei 1 500 V im 373-A ABI DNA-Sequenzer nach der *Taq Cycle-Sequencing*-Methode mit Hilfe der „Data Collection“-Software gescannt.

Mittels Abgleichs der gewonnenen TCR-γ- und -β-Gensequenzen mit der EMBO- und NCBI-Datenbank (82) wurden die patientenspezifischen N-Sequenzen bestimmt.

2.4 Klonspezifische PCR

2.4.1 Entwicklung eines N-spezifischen Primers

Der Primer wurde so entworfen, dass das 3'-Ende des Primers spezifisch an der N-Sequenz binden sollte.

Die Entwicklung der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms *OLIGO 5.0 Primer Analysis Software*.

Die für die einzelnen Analysen notwendigen Parameter wurden gemäss den in OLIGO 5.0 für eine hochstringente Primersuche festgelegten Parametern gewählt. Das 3'-Ende umfasste dabei die letzten 5 Basenpaare:

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

Desweiteren wurde die Schmelztemperatur der einzelnen Oligonukleotide berechnet und verglichen. Grundlage hierfür waren die Verfahren nach Breslauer (20) ($2(A+T)^\circ + 4(G+C)^\circ$)-Methode und Wetmur (111) (*Nearest-Neighbor-Method*). Als maximale Differenz der Schmelztemperaturen wurden 10°C festgelegt. Bei

Unterschieden der mit den beiden Verfahren berechneten Differenzen wurde für die Bewertung das Ergebnis nach der *Nearest-Neighbor-Method* zugrunde gelegt.

2.4.2 Optimierung der Bedingungen der klonspezifischen PCR

- Primer für TCR- γ : V γ cons und patientenspezifischer J-Primer
- Primer für TCR- β : V-Primer familienspezifisch für die beim Patienten rearrangierte V β -Sequenz, als J β -Primer der patientenspezifische Primer (s. Tab. 5, S.39 und Tab. 8, S. 51).

Als Negativkontrollen wurden von je 4 mono- bzw. polyklonalen PBMC-Proben anderer Patienten, als Positivkontrolle 5 μ l der klonalen Patienten-DNA aus der PCR, in der das monoklonale Rearrangement gezeigt werden konnte, eingesetzt und das Produkt, wie oben beschrieben, auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Dabei wurden sukzessive die Schmelztemperatur erhöht und die dNTP- und MgCl₂ – Konzentrationen reduziert, bis

1. das PCR-Produkt in der zu erwartenden Größe nur in der den Klon enthaltenden Patienten-DNA amplifiziert wurde und
2. im Agarosegel mit der Patienten-DNA als Template keine unspezifischen Produkte mehr erkennbar waren.

Die so gefundenen PCR-Bedingungen wurden in der klonspezifischen PCR beibehalten.

Von SPP-Patienten wurden 5 μ l aus Haut- und Blutproben gewonnener DNA mit den N-spezifischen Primern in einer klonspezifischen PCR eingesetzt und mit Hilfe eines 2%igen Agarosegels aufgetrennt. Aus den mit Hautproben von SPP-Patienten durchgeführten Reaktionen wurden 2 μ l des PCR-Produkts in einer klonspezifischen Re-PCR mit Vseq und dem klonspezifischen Primer eingesetzt und in einem Agarosegel getrennt.

2.5 Quantifizierung mittels SYBR-Green

Vor Einsatz im LightCycler wurde die DNA mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kit nochmals gereinigt. Die DNA wurde danach in 200µl Elutionspuffer gelöst.

Zum Herstellen eines klonspezifischen Standards wurden jeweils 5 µl, d.h. 250µg DNA aus der diagnostischen Hautprobe in einer klonspezifischen PCR eingesetzt. Nach Auftrennen der PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel wurde die monoklonale Bande ausgeschnitten und mittels High Pure PCR Product Purification Kit aufgereinigt. Zur Quantifizierung wurden verschiedene Mengen des gereinigten PCR-Produktes und des Markers Hinc III Lambda auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Unter Zuhilfenahme der Software Wincam Version 2.2 konnte bei bekannter Markerkonzentration auf die Konzentration des Standards geschlossen werden.

PCR im LightCycler

Die im LightCycler eingesetzten Reaktionsgemische (20 µl) enthielten 1x Puffermischung aus SYBR Green I-Farbstoff und Hot-Start-Taq-Polymerase, 4 mM MgCl₂, je 0,5 µM der Primer Vg cons und Jg cons und 2 µl DNA.

In der Einstell-PCR wurde die Konzentration der TCR-γ I-Rearrangements ermittelt und alle Proben auf den gleichen Wert eingestellt. Als Standard wurde eine 10er-Verdünnungsreihe aus DNA der Jurkat-Zelllinie, wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben gewonnen, eingesetzt. Einer Denaturierung über 10 min bei 95 °C schlossen sich 40 Zyklen mit je 5 Sekunden bei 58°C und 15 Sekunden bei 72°C an, der Fluoreszenzmesspunkt lag bei 79 °C. Zur Schmelzkurvenanalyse wurde während des Erwärmens von der Annealingtemperatur auf 95 °C in Temperaturunterschieden von 0,2 °C gemessen.

In der klonspezifischen PCR wurde die Konzentration der klonalen T-Zell-Rearrangements mittels eines, wie oben beschrieben, hergestellten klonspezifischen Standards bestimmt. Die Reaktionsbedingungen glichen denen der Einstell-PCR, es wurden 0,67 µM der klonspezifischen Primer und die im ersten Schritt bestimmte Menge an DNA eingesetzt. Als Annealingtemperatur und MgCl₂-Konzentration wurden die für den klonspezifischen Primer spezifische Temperatur bzw. Konzentration gewählt. Alle Proben wurden doppelt bestimmt.

Auswertung der LightCycler-Daten

Bei der Auswertung der LightCycler-Daten wurden mittels der *second derivate maximum*-Methode die Konzentrationen der Ziel-DNA bestimmt. Als Standardkurve wurden 5 Verdünnungsstufen einer 10er-Verdünnungsreihe eingesetzt.

Die für die einzelnen Analysen notwendigen Parameter wurden gemäss den in der LightCycler-Software für eine akkurate Analyse mit externem Standard festgelegt:

- Abweichung der Standardverdünnungsreihe statthaft, wenn maximal 0,10 Standardabweichung von der Standardkurve.
- Effizienzunterschiede zwischen Standard und Ziel-DNA statthaft bis zu einem Wert von 0,05 (91). Dies wurde mittels zweier Verdünnungsreihen bestimmt, wobei die Steigung (*slope*) der Kurven in halblogarithmischer Darstellung $-1/\log$ der Effizienz beträgt.
$$\text{Slope} = -1/\log E$$
- Schmelztemperaturenunterschiede zwischen DNA und Standard nicht statthaft.

2.6 Spezifitätsprüfung

Zur Überprüfung der Spezifität der klonspezifischen Primer wurde von zwei Patienten Produkt aus der TCR- γ -1-PCR mit Hilfe des „TOPO TA Cloning-Kits“ der Firma Invitrogen kloniert. Dadurch entstand sowohl DNA mit der klonalen Zielsequenz beider Patienten als auch mit davon unterschiedlicher Sequenz aus polyklonalen T-Zellen.

Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ durchgeführt.

Zur Überprüfung des Ergebnisses der klonspezifischen PCR wurde die Plasmid-DNA in zwei Fraktionen aliquotiert. Ein Teil der Plasmid-DNA wurde, wie oben beschrieben, sequenziert, ein anderer in einer klonspezifischen PCR eingesetzt. Die Ergebnisse der Sequenzierung und klonspezifischen PCR wurden miteinander verglichen. Wurden sowohl in der klonspezifischen PCR als auch in der Sequenzierung die Zielsequenz nachgewiesen, wurde dies als richtig-positiv gewertet. Ein Nachweis der Ziel-DNA mittels klonspezifischer Primer trotz in der Sequenzierung nachgewiesener Verschiedenheit von der Zielsequenz wurde als falsch-positiv gewertet. Der fehlende

Nachweis mittels klonspezifischer PCR trotz in der Sequenzierung nachgewiesener Zielsequenz wurde dagegen als falsch-negativ eingeordnet.

2.7 Korrelation zur Klinik

Mittels der Daten aus der Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil der klonalen Zellen an der Gesamtheit der T-Zellen errechnet und im zeitlichen Verlauf dargestellt. Aus den Aufzeichnungen des Krankheitsverlaufs wurden der Hautbefund und der Zeitpunkt der Probenentnahmen ermittelt. Ausserdem wurden das Vorliegen von Lymphadenopathie sowie radiologische und sonographische Befunde und die angewandte Therapie aufgezeichnet und zeitlich mit den quantitativen Daten in Bezug gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung klonaler Zellen in peripherem Blut von MF-Patienten

3.2 Sequenzierungsergebnisse

Bei 47 Patienten, die histologisch und klinisch gesichert an einer Mycosis fungoides erkrankt waren, konnte retrospektiv in der Haut mit den TCR- γ -Konsensusprimern ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden. Bei 3 Patienten (GL, PL und WA) konnte in beiden Allelen ein monoklonales Amplifikat gezeigt werden, so dass insgesamt 50 DNA-Sequenzen ermittelt wurden (s. Tab. 7, S. 49). Von allen ermittelten Sequenzen betrug die mittlere Länge der N-Region 6,8 Basenpaare (Bp) (Median 6 Bp, x_{\max} =18 Bp; x_{\min} = 0 Bp). Der GC-Anteil an den N-Sequenzen betrug im Mittel 56,3% (Median 60%, x_{\max} =80%, x_{\min} =16,6%). Die Segmente V γ 2 und V γ 8 waren mit 50 bzw. 18% überdurchschnittlich repräsentiert, in 88% der Fälle wurde ein Rearrangement der V γ I-Familie, in 12% Rearrangements der Familien V γ II - IV gefunden (s. Abbildung 3).

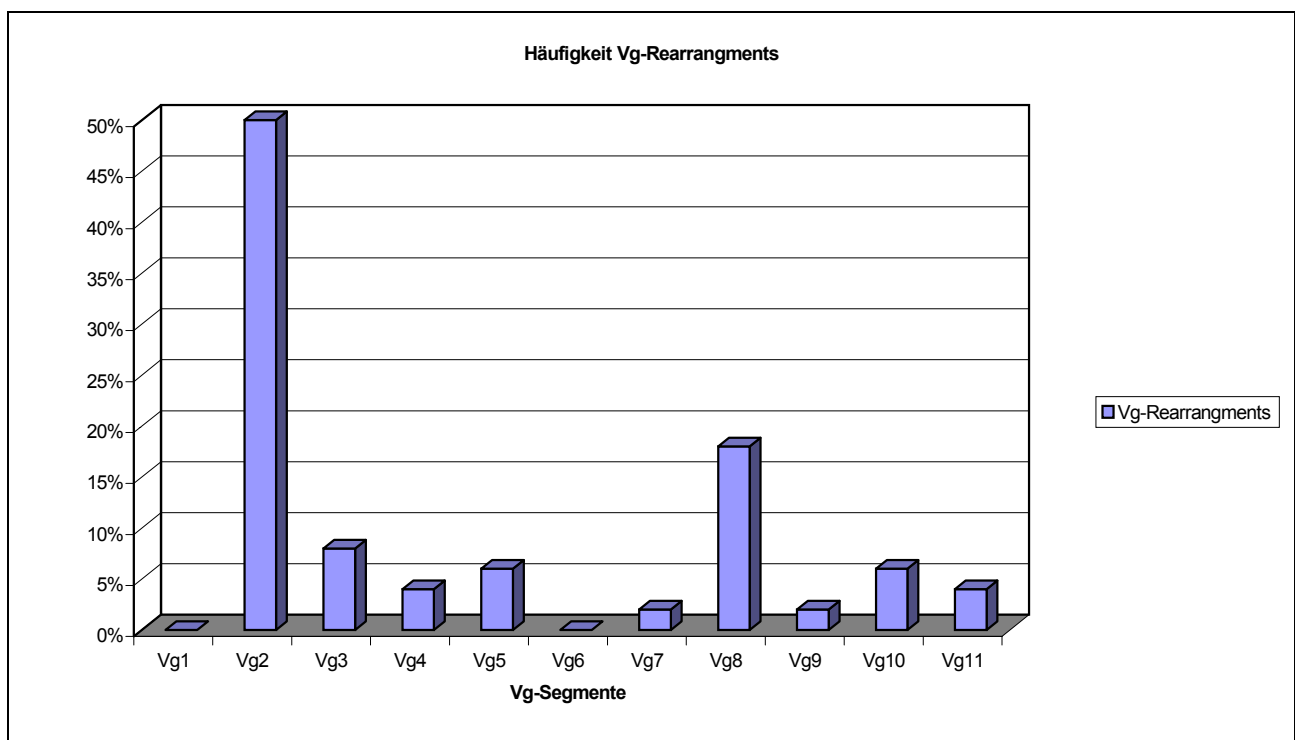


Abb. 3: Häufigkeit der Vg-Rearrangments

Von 6 Patienten konnte mit Hilfe der TCR- β -Konsensusprimer ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden. Da bei einem Patienten in beiden Allelen ein

monoklonales Amplifikat gezeigt wurde, konnten daraus 7 Sequenzen ermittelt werden (s. Tab. 6). Von den ermittelten DNA-Sequenzen betrug die mittlere Länge der N-Region 14 Basenpaare (Median 10 Bp, x_{\max} =30 Bp; x_{\min} = 5 Bp). Hier betrug der GC-Anteil durchschnittlich 66,1% (Median 71,4%, x_{\max} =80%, x_{\min} =46%).

Tab. 6: TCR- β -Sequenzen, N-Sequenzen sind unterstrichen

Pat.	Sequenz	N-Region (Bp)	GC-% insges.	Primer	Verlauf vorhand.
GL	Vb7s1 AGCCAAG <u>(D2)CGG(N)AGAG</u> CTCCTACGAG J2-7	7	71	-	-
	Vb13s6 CCAGCAG <u>CCCAGGGACTAGCGGGAGTTACA</u> AGCAG Jb2s4	25	56	+	+
HÖ	Vb22s1 CAGTGAA <u>CAGGC</u> CTATGGCT Jb1s2	5	80	+	-
LO	Vb13s3 TGCCAGC <u>GGGAC</u> TGAGCAGTT J2S1	5	80	+	+
RA	Vb5s1 AGCTTGG <u>GTGTCAGGAG</u> GAACACTGAAG J1s1	10	60	+	-
ZO	Vb3S1 TTATAT <u>GCGGTATGGCAGGGAGACTTCGAAAAAGTT</u> CA 30 J2S5		47	+	-
MA	Vb13s4 CAGCAG <u>(N)CCCA(D2)GGGACTAGCGGG</u> AGTTAC J2-4	16	75	-	

3.2.1 Klonspezifische Primer

Es wurde versucht, für die patientenspezifischen TCR-Sequenzen spezifische Primer zu entwerfen.

Da für die N-Region von 11 Sequenzen mit einer Länge von 0 bis 2 Basenpaaren die Bildung eines spezifischen PCR-Produktes zwischen N-spezifischem Primer und DNA unwahrscheinlich war, wurde für diese auf die Entwicklung eines Primers verzichtet.

Für insgesamt 24 Sequenzen war das Design eines klonspezifischen Primers nicht möglich. Die N-Regionen dieser Sequenzen besaßen im Mittel eine Länge von 6,5 Basenpaaren (Median 6 Bp; x_{\max} = 18 Bp; x_{\min} = 3 Bp). Der mittlere GC-Anteil betrug 54,3% (Median 60%, x_{\max} = 80%, x_{\min} = 16,6%). Davon zeigten von 5 Sequenzen die klonspezifischen Primer Schmelztemperaturunterschiede $>10^{\circ}\text{C}$ zu den V γ -Primern. Die klonspezifischen Primer für 3 Sequenzen bildeten Primer-Dimere mit $dG < -7,5$ kcal/mol und mit einer Länge von mehr als 4 Basenpaaren, für eine Sequenz zeigten alle möglichen, klonspezifischen Primer falsche Bindungsstellen. Die Bildung von Haarnadelstrukturen war unbedeutend.

Tab. 7: TCR- γ -Sequenzen in Haut der MF-Patienten; N-Region; + Primerdesign bzw. Verlauf möglich

Pat.	Sequenz	N-Reg.	GC-% Insg.	Primer	Verl. vorhand.
BÄ	Vg8 CTGGGATAGG <u>GTTGTAGT</u> TATAAGAAAC Jg1	8	37,5	-	
BE	Vg2 CTGGGACGGG <u>CGGTGGTACCAAC</u> TATAAGAAAC Jg2	13	61,5	+	-
BN	Vg2 CTGGGACGGG <u>CCTGATGATTGGG</u> TATAAGAAAC Jg1	13	54	+	-
BO	Vg3 CTGGGACAGG <u>CTCAGGT</u> AATTATTATAAG Jg2	7	57	-	
BR	Vg4 ACTGTGCCAC <u>CTATI</u> GAATTATTAT Jg1	5	20	-	
DE	Vg10 TGCTGCGTGG <u>GGAAGCATTACGGGAG</u> ATAAGAACT Jg1	17	53	+	-
FI	Vg2 ACCTGGGACG <u>AGATACCGATAG</u> ATAGTAGTG JGP2	12	42	+	+
FE	Vg3 TCTATTACTG <u>TGCCCCNNGG</u> GAATGGTTATA Jg1	10	70	-	
FR	Vg2 CTGGGACGGG TATTATCAGA Jg2	0	-	0	
GL	Vg5 CCTGGGACAG <u>AACA</u> ATTATAAGAA Jg2	4	25	-	
	Vg2 CACCTGGGAC <u>AAAACA</u> ATTATAAGAA Jg1	6	17	-	
HA	Vg2 CTGGGACGGG <u>TACCTCGCCGGTAGGG</u> TATTATAAGA Jg2	16	69	+	+
HE	Vg2 CTGGGACGGG <u>CTTGAGAC</u> TATAAGAAAC Jg1	8	50	+	+
HEI	Vg2 CTGGGACAGG <u>CACC</u> TTATAAGAAA Jg1	4	75	-	
HN	Vg8 CTGGGATAGG <u>AAACTC</u> GAATTATTAT Jg1	6	33	-	
HT	Vg3 TCTATTACTG <u>TGCCCCCTGTG</u> GAATTATTAT Jg1	10	70	+	-
HR	Vg2 CCCCTGGGAC <u>TGG</u> TATTATAAGA Jg1	3	66	-	
HI	Vg2 CCTGGGACGG TATTATAAGA Jg1	0	-	0	
HÖ	VG8 CTGGGATAGG <u>CCTTAGC</u> AAGAACTCT Jg1	8	50	-	
HRY	Vg2 CACCTGGGAG <u>TGG</u> TATTATAAGA Jg1	3	66	-	
IV	Vg3 CCACCTGGGA <u>GCCTA</u> ATAAGAACT Jg1	5	60	+	-
JA	Vg2 CCTGGGACGG <u>GA</u> TTATTATAAA Jg1	2	50	0	
JE	Vg5 TGGGACAG <u>ATCTCCCTGG</u> AAGAACTCTTT JG2	10	60	+	-
KR	Vg8 CTGGGATAGG <u>GCAAAACAC</u> ACTCTTTGGC Jg1	9	44	-	
LA	Vg2 CTGGGATGGG <u>CGAGG</u> TATAAGAGAC Jg2	5	80	+	+
LE	Vg8 CCTGGGATAG <u>AA</u> ATTATATAAG Jg1	2	0	0	
LO	Vg2 CTGGGACGGG <u>CC</u> TTATTATAAG Jg1	2	100	0	
MH	Vg8 CCACCTGGGA <u>TGAGC</u> AATTATTATA Jg1	5	60	-	

Pat.	Sequenz	N-Reg.	GC-% Insg.	Primer	Verl. vorhand.
ML	Vg5 T TACTGTGCC <u>CCTGTG</u> GAATTATTAT Jg1	6	66	-	
MN	Vg2 CTGGGACGGG <u>GGCGGATG</u> GAAACTCCTT Jg1	8	75	-	
ME	Vg2 TGCCACCTGG <u>AAATGT</u> TATTATAAAA Jg1	6	17	-	
MI	Vg8 CACCTGGGAT <u>G</u> GAATTATTAT Jg1	1	100	0	
MO	Vg2 CTGGGACGGG TATTATAAGA Jg1	0	-	0	
MR	Vg2 CTGGGACGGG <u>CC</u> ATTATAATAA Jg1	2	100	0	
OT	Vg2 CTGGGACGGG <u>CTTGAGAC</u> TATAAGAAAC Jg1	8	50	+	-
PA	Vg8 TGTGCCACTG <u>TA</u> GAATTATTAT Jg1	2	0	0	
PL	Vg10 TGCTGCGTGG <u>GAGCC</u> CCACTGGTTG JP1	5	80	-	-
	Vg11 ACTGTGCCTG <u>CTGGATTAGAGTGGG</u> CCACTGGTTG JP1	15	53	+	
RA	Vg10 TGCTGCGTGG <u>GAGGGGT</u> TTATTATAAG Jg1/2	7	71	-	
RI	Vg11 ACTGTGCCTG <u>CTGGATTAGGCACGTGAAAGAAACTC</u> Jg2	18	56	-	
SE	Vg2 CCACCTGGGA <u>TGAGCCGAACI</u> ATTATTATAA Jg1	11	45	+	-
SU	Vg8 ACTGTGCCAC TCTTTGGCAG Jg2	0	-	0	
ST	Vg4 GTGCCACCTG <u>CCTC</u> GAATTATTAT Jg1	4	75	-	
VI	Vg2/7 CACCTGGGAC <u>AATGACCCCGGGI</u> TAATTATTAT Jg2	13	62	+	-
WA	Vg2 CACCTGGGAC <u>TAAGC</u> TATTATAAGA Jg1	5	40	-	
	Vg9 CTGTGCCTTG <u>TGGGAGGTG</u> TAAGAAACTC Jg1	9	66	-	
WU	Vg2 CACCTGGGAC <u>TGG</u> TATTATAAGA Jg1	3	66	-	
ZO	Vg2 CTGGGACGGG <u>CCTCACGG</u> TTATTATAAG Jg1	8	75	+	+
ZR	Vg2 CCTGGGACGG ATTATTATAA Jg1	0	-	0	
ZW	Vg7 ACCTGGGACA <u>ITCCC</u> CTGGTTGGTT JP1/2	5	60	-	
JU	Vg8 TGCCACCTGG <u>AAATI</u> TTATTATAAG Jg1	5	0	+	
	Vg11 GTGCCTG <u>TCAGATCCTCACAGGGCGGGTT</u> TTAAGGC	22	59	0	

Für 15 Patienten konnte ein klonspezifischer TCR- γ -Primer und für 5 Patienten ein klonspezifischer TCR- β -Primer entwickelt werden. Hier betrug die mittlere Länge der N-Sequenzen bei den TCR- γ -Sequenzen 11,2Bp (Median 11 Bp; x_{\max} = 17Bp; x_{\min} = 5 Bp) und 15 Bp (Median 10 Bp; x_{\max} = 30Bp; x_{\min} =5 Bp) bei den TCR- β -Sequenzen. Der GC-Anteil lag bei durchschnittlich 59,5% (Median 60%, x_{\max} = 80%, x_{\min} = 41,6%) für die γ -Sequenzen und 57% (Median 60%; x_{\max} = 80%, x_{\min} =50%) für die β -Sequenzen. Der GC-Anteil der letzten 5 Basenpaare am 3'-Ende der Primer lag für die TCR- γ -Primer

durchschnittlich bei 40% ($x_{\max}=80\%$, $x_{\min}=0\%$), für die TCR- β -Primer bei 63% ($x_{\max}=80\%$; $x_{\min}=60\%$).

Es konnte nur für 15 von 49 (30,6 %) TCR- γ -Sequenzen ein klonspezifischer Primer etabliert werden. Von 7 TCR- β -Sequenzen konnte für 5 ein Primer entworfen werden, was einem Anteil von 71,4 % entspricht.

Tab. 8: Sequenzen der klonspezifischen Primer mit PCR-Bedingungen, Mg-Konz.: MgCl₂-Konzentration

Name	Sequenz	Typ	Mg-Konz (mmol).	Annealing temp.
FI g	Vg2 ACCTGGGACGAGATACCGATAGATAGTAGTGATTGGAT JGP2 TCTATGGCTATCTATCATCACT	gamma	4	62°C
HE g	Vg2 CTGGGACGGGCTTGAGACTATAAGAAACTCTTTGG Jg 1/2 GAACTCTGATATTCTTTGAGAA	gamma	1,5	
HA g	Vg2 CTGGGACGGGTACCTCGCCGGTAGGAAGAAACTCTTTGG Jg2 GAGCGGCCATCCTTCTTT	gamma	2,5	58°C
GL b	Vb13s6 CCAGCAGCCCAGGGACTAGCGGGAGTTACAAGCAGTACT Jb2s4 TCGCCCTCAATGTTTCGTCATG	beta	4	62°C
LA g	Vg2 CTGGGATGGGCGAGGTATAAGAGAC Jg2	gamma	1,5	58°C
ZO g	Vg2 CACCTGGGACGGATTATTATAAGAAACTCTTTGG Jg 1/2 CCTAATAATATTCTTTGAGA	gamma	2	
LO b	Vb13s3 CTGTGCCAGCGGGACTGAGCAGTTCTTCGGCC J2S1 CTGACTCGTCAAGAAGCCGG	beta	4	70°C 2-Schritt
RA b	Vb5s1 AGCAGCTTGGGTGTCAGGAGGAACACTGAAGCTATCTTT J1s1 CAGTCCTCCTTGACTTCGA	beta	4	68°C 2-Schritt
ZO b	Vb3S1 TTTATATCGGGTATGGCAGGGAGACTTCGAAAAAGTTCA J2S5 CCATACCGTCCCTCTGAAGCT	beta	2,5	70°C 2-Schritt

3.2.2 Spezifität und Sensitivität der klonspezifischen PCR

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde die MgCl₂-Konzentration von 4 um jeweils 0,5mM bis minimal 1,5mM reduziert und, falls nicht ausreichend, die Annealingtemperatur um je 2°C erhöht, bis sich im Agarosegel ein PCR-Produkt nur in der gewünschten Probe mit der erwarteten Produktlänge darstellte. Die Primer und PCR-Bedingungen sind in Tab. 8 (S. 51) dargestellt.

Zur Spezifitätsprüfung wurden von zwei MF-Patienten Produkte aus der Konsensus-PCR kloniert. Es wurden 20 Klone aufgenommen, 14 von Patient ZO und 6 von Patient BÄ, und die DNA jedes Klons in zwei Fraktionen (A und B) aliquotiert. Fraktion A wurde

in einer PCR mit dem für Patient ZO klonspezifischen Primer reamplifiziert. Da durch die Klonierung neben der Generierung von DNA mit dem klonalen auch die eines polyklonalen Rearrangements möglich war, wurden die Ergebnisse der klonspezifischen PCR mittels direkter Sequenzierung von Fraktion B überprüft. Beim Vergleich der Ergebnisse konnte in 18 von 20 Fällen (90%) eine Übereinstimmung festgestellt werden. In 2/20 Fällen zeigte die klonspezifische PCR ein positives Ergebnis, obwohl die monoklonale DNA bei der Sequenzierung nicht nachgewiesen wurde (Tab. 9).

Tab. 9: Spezifitäts-Nachweis: Klonspez. Primer ZI 1, Einzelzell-PCR- F.Z.Zellen 1,2,3,16,18, 20, 22-30 Zellen ohne Einzelzell-PCR-Produkt, Klon-spez.PCR negativ, *0,6 dNTP/2mM MgCl₂

Zelle	Sequenz direkt	Klon	Klonspez. PCR °C					Sequenz kloniert
			58	59	60	61	*58°C	
4	CCTCACGG	1	+	+	+	+	+	
5	CCTCACGG	1	+	+	+	+	+	
6	CCTCACGG	1	+	+	+			
10	CCTCACGG	1	+					
11	CCTCACGG	1	+	+	+			
12	TAAGGG		+	+	(+)	-	-	TAAGGG
13	AAAGAGGC		+	+	+	+	+	AAAGAGGC
14	CCTCACGG	1,2	+			+	+	CCTCACGG
	TAAAGAGGCG							TAAAGAGGCG
19	CctcaCGG	1,2	+			+	+	CCTCACGG
	TAAAGAGGCG							TAAAGAGGCG
36	TAAAGAGG		-				-	
42	CGA		-				-	
44	CA		-				-	
45	CCTTC		-				-	
46	CAGGAaTTT		-				-	
55	CAGGCCTC				-	-	-	
56	CAGGCCTC				(+)	-	+	x
57	C				+		-	x
58	CAGTGGAAC				-		-	
59	TTGG		-				-	
17		1,2	+					CCTCACGG
								TAAAGAGGCG

Um die Sensitivität der klonspezifischen PCR zu prüfen, wurde für die Jurkat-Zelllinie ein spezifischer Primer entwickelt. Mit Hilfe einer 10fach-Verdünnungsreihe von Jurkat-DNA in aus PBMC eines gesunden Probanden gewonnener DNA konnte ein spezifisches Produkt bis zu einer Verdünnung von 10 Zellen in 10⁶ Zellen, also 1

klonale in 10^5 polyklonalen Zellen als Hintergrund nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4).

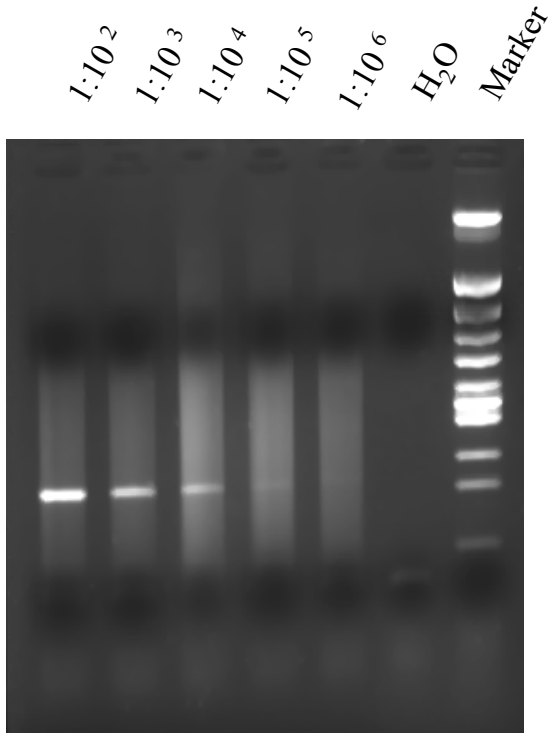


Abb. 4: Klonale Jurkat-Zellen vor polyklonalem Hintergrund in oben angegebener Verdünnung, H₂O: Negativprobe; Marker: Hinc III Lambda; klonsspezifischer Primer: Ju

3.2.3 Detektion zirkulierender, klonaler Zellen im Verlauf

Von 5 Patienten, für die ein klonsspezifischer Primer entworfen werden konnte, waren mehr als 5 Blutproben im Verlauf vorhanden. Diese Blutproben wurden in einer klonsspezifischen PCR quantifiziert.

Bei 4 Patienten konnte mit Hilfe der klonsspezifischen Primer die klonale Sequenz aus der Haut auch in den Blutproben detektiert werden.

1. Bei Patient FI (s. Tab. 10) wurden 11 Blutproben aus einem Zeitraum von 53 Monaten untersucht. Mittels PCR mit Konsensusprimern konnte in keiner der Proben ein monoklonales Amplifikat gefunden werden, mittels klonsspezifischer PCR neben der Blutprobe bei Erstdiagnose 02/1997 in neun weiteren Proben. Zum Zeitpunkt der kompletten Remission 05/1997 war die Detektion des monoklonalen Rearrangements im Blut nicht möglich.

Tab. 10: Patient FI: Ergebnisse der Routine-PCR, klonspezifischen PCR und Quantifizierung im LightCycler im Vergleich. PCR-TGGE: Ergebnisse der Routine-PCR mit TGGE, poly: polyklonal, mono: monoklonal, bi: biklonal; sq TuZ: semiquantitative Abschätzung im Agarosegel nach klonspez. PCR, Grad 0 bis +++; % TuZ: im LightCycler bestimmter Anteil an Tumorzellen im Blut, Therapie: bis zur Blutabnahme erhaltene Therapie

Number	R-Nr	PCR-TGGE	Sq. TuZ	% TuZ	Verlauf	Therapie
02/97	5611	poly	+	0,000	TNM IIa	0
05/97	5867	poly	0	1,860	Regredienz	PUVA / IFN / Steroid
08/97	6142	poly	+	0,780	komplette Remission	dto.
01/98	6617	poly	(+)	2,135	dto.	0
07/98	7371	poly	+	0,000	Rezidiv	0
11/98	7869	poly	+	8,800	komplette Remission	Steroid
03/99	8332	poly	+	2,088	Rezidiv	PUVA
12/99	9521	poly	+	5,245	Rezidiv	Steroid
04/00	10464	poly	+	0,905	Progressive Disease	Steroid
04/01	20413	poly	+	1,530	komplette Remission	0
07/01	20865	poly	+	1,113	Rezidiv	0

2. Bei Patient GL (s. Tab. 11, S.56) wurden 17 Blutproben aus einem Zeitraum von 38 Monaten getestet. Mittels Konsensusprimern konnte in 4, mittels klonspezifischer PCR in 12 Proben ein monoklonales Rearrangement ermittelt werden. Von der Erstdiagnose 12/1997 bis 01/1999 konnte mit Ausnahme vom Mai 1998 während progredienter Erkrankung durch keine der Methoden ein monoklonales Amplifikat gezeigt werden, im Mai 1998 war mittels klonspezifischer PCR ein monoklonales Rearrangement detektierbar. Ab 02/1999 bis 05/1999 war nur mit Hilfe der klonspezifischen Methode Monoklonalität, ab 10/1999 waren auch mit den Konsensusprimern ein mono- bzw. biklonales Amplifikat sowohl im Tumorstadium als auch während Remission nachweisbar.

3. Bei Patient LO (s. Tab. 12, S.58.) wurden über einen Zeitraum von 43 Monaten 14 Blutproben untersucht, wobei in keiner der Proben mit Hilfe der Konsensusprimer ein monoklonales Amplifikat gezeigt werden konnte. Neben der Erstdiagnose 11/1997 konnte mittels klonspezifischer PCR in neun weiteren Proben das klonale Rearrangement bei sowohl re- als auch progredienter Erkrankung nachgewiesen werden.
4. Bei Patient ZO (s. Tab. 13, S.60) wurden 10 Proben über eine Zeit von 17 Monaten überprüft, in zwei Proben wurde mit Hilfe der Konsensusprimer ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen. Neben der Erstdiagnose 12/1997 wurde mittels klonspezifischer PCR in den 4 weiteren Blutproben bis 01/1999 das klonale Rearrangement gezeigt, in den übrigen war dies nicht möglich.

Mit Hilfe der PCR mit Konsensusprimern wurde bei den 4 Patienten nur in 6/52 Blutproben die klonale Sequenz nachgewiesen, mit den klonspezifischen Primern war dies in 39/52 dieser Fälle möglich (siehe Tabelle 10,11 und 12). Bei den letztgenannten konnte eine Verlaufskontrolle der im Blut zirkulierenden klonalen Zellen mittels *Real time*-PCR vorgenommen werden.

In den Blutproben von Patient RA konnte die β -Sequenz aus der Haut nur bei Erstdiagnose nachgewiesen werden. In den restlichen Blutproben war die Sequenz mit den klonspezifischen Primern nicht nachweisbar und somit eine Quantifizierung im Verlauf nicht möglich.

3.2.4 Quantifizierung

Die Produktmenge der klonspezifischen PCR wurde im Agarosegel mittels einer Einteilung von null über „+“ bis „+++“, d.h. von wenig über mittel bis viel Produkt semiquantitativ abgeschätzt.

1. Bei Patient FI (siehe Tab. 10) wurde im Agarosegel im Verlauf null bis + PCR-Produkt gesehen. + PCR-Produkt war in neun Proben sowohl während pro- als auch regredienter Erkrankung nachweisbar, zum Zeitpunkt der klinischen Remission 05/1997 konnte null und bei stabiler Remission 01/1998 nur + Produkt ermittelt werden.
2. Bei Patient GL (siehe Tab. 11) war zwischen null und +++ Produkt sichtbar. Mit Ausnahme von 05/1998 mit + PCR-Produkt konnte bei progredienter Erkrankung das monoklonale Rearrangement mit Hilfe des klonspezifischen

Primers bis 01/1999 nicht und ab 02/1999 mit einer Menge von ++ nachgewiesen werden. Die Menge stieg 12/1999 während Rückbildung der kutanen Tumoren weiter an. Von 11/2000 bis 02/2001 schwankten bei kompletter, klinischer Remission die Produktmengen im Agarosegel zwischen einer Intensität von +++ und + .

3. Bei Patient LO (siehe Tab. 12) veränderte sich die Produktquantität im Verlauf zwischen nicht nachweisbarer und mittlerer Menge. Nach Erstdiagnose 11/1997 sank sie während kompletter Remission auf null, um während eines Rezidivs 03/1999 und partieller Remission 10/1999 auf eine Menge von ++ anzusteigen. Während progressiver Erkrankung fiel die Produktmenge auf + bis null, zum Ende der Progression 02/2001 und während klinischer Remission 04/2001 stieg sie wieder auf ein Niveau von ++.
4. Bei Patient ZO (siehe Tab. 13) bewegten sich die Produktmengen im Verlauf zwischen + bis null. Von dem Zeitpunkt der Erstdiagnose 12/1997 bis 01/1999 war im Agarosegel (+) bis + Produkt, ab 01/1999 kein Produkt mehr eruierbar.

Tab. 11: Patient GL: Ergebnisse Routine-PCR, klonspezifische PCR und Quantifizierung im LightCycler im Vergleich. Erläuterungen siehe **Tab. 10**

Datum	Name	PCR-TGGE	Sq. TuZ	% TuZ	Klinik	Therapie
12/97	6422	poly	0	0,8	TNM IIB	PUVA/IFN
05/98	7144	poly	+	0	Progressive Disease	PUVA/IFN
10/98	7625	poly	0	0,0	Lk pos.	Retinoide/PUVA/IFN
11/98	7829	poly	0	0,0	Progressive Disease	HC-Vakzination
01/99	8062	poly	0	0,0	dto.	dto.
01/99	8158	poly	0	3,0	dto.	dto.
02/99	8261	poly	++	2,2	dto.	dto.
03/99	8394	poly	++	4,7	dto.	dto.
04/99	8513	poly	++	3,6	dto.	dto.

Datum	Name	PCR-TGGE	Sq. TuZ	% TuZ	Klinik	Therapie
05/99	8592	poly	++	5,6	dto.	ECP/PUVA
10/99	9282	mono	++	5,1	dto.	MTX
12/99	9463	bi	+++	29,5	T3↓/ T1/2↑	MTX
01/00	10029	poly	+	5,2	T3↑	PUVA
03/00	10246	poly	+	0,0		MTX
11/00	11103	bi	+++	91,1	Kompl. klin. Remission	MTX / Targretin
01/01	20036	poly	+	21,0	dto.	0
02/01	20187	bi	++	8,0	dto.	0

Bei 3 MF-Patienten konnte im LightCycler mittels *Real time*-PCR mit SYBR Green eine quantitative Verlaufsbeobachtung der klonalen, im Blut zirkulierenden Zellen durchgeführt werden.

1. Bei Patient FI konnte in 9 Blutproben mittels *Real time*-PCR ein Anteil klonaler Rearrangements von 0,78 bis 8,8% bei einer mittleren Standardabweichung von 42,1% ($x_{\min}=20,5\%$, $x_{\max}=112,0\%$) gefunden werden (s. Abb. 12, S.85).
2. Bei Patient GL wurde in 12 Proben über einen Zeitraum von 38 Monaten zwischen 0,8 und 91,1% klonale Rearrangements bei einer mittleren Standardabweichung von 32,9% ($x_{\min}=1,0\%$; $x_{\max}=72,1\%$) eruiert (s. Abb. 10, S.83).
3. In 9/14 Blutproben über einen Zeitraum von 36 Monaten wurden bei Patient LO monoklonale Rearrangements mit einem Anteil zwischen 1,4 und 6,5% nachgewiesen, hier betrug die mittlere Standardabweichung 38,6% ($x_{\min}=3,4\%$; $x_{\max}=110,0\%$) (s. Abb. 11, S.84).
4. Bei Patient ZO (siehe Tab. 13), bei dem in 5 Blutproben das klonale Rearrangement aus der Haut mit klonspezifischer PCR und Auftrennung im Agarosegel nachgewiesen werden konnte, war die klonale DNA mit Hilfe des LightCyclers nicht darstellbar und quantifizierbar.

Tab. 12: Patient LO: Vergleich der Ergebnisse der Routine-PCR mit denen der klonalspezifischen PCR und Quantifizierung im LightCycler. Erläuterungen s. Tabelle 10

Datum	Name	PCR-TGGE	Sq. TuZ	% TuZ/TZ	Klinik	Therapie
11/97	6340	poly	+	0	TNM IIB	PUVA/IFN
06/98	7230	poly	0	1,5	kompl. Remission	PUVA/IFN
03/99	8351	poly	++	2,9	Rezidiv	PUVA
10/99	9276	poly	++	1,4	part. Remission	PUVA
11/99	9391	poly	+	0,0	Rezidiv	0
02/00	10207	poly	++	4,4	progr. Disease	Steroid
07/00	10772	poly	0	0,0	dto.	Steroid
08/00	10861	poly	0	0,0	dto.	Hybridzell- Vakzination
09/00	10945	poly	+	4,3	dto.	dto.
10/00	11055	poly	0	0	dto.	dto.
11/00	11132	poly	+	5,0	dto.	dto.
02/01	20183	poly	++	4,6	dto.	PUVA/IFN
04/01	20400	poly	++	2,9	kompl. Remission	PUVA/IFN
06/01	20729	poly	++	6,5	Rezidiv	0

Fasst man die Ergebnisse der *Real time*-PCR zusammen, stellt man bei den 3 Patienten, für die eine Quantifizierung durchgeführt wurde, fest, dass sich der Anteil klonaler Zellen im Blut im Verlauf der Erkrankung ändert, bei den Patienten FI und LO maximal um den Faktor 10, bei Patient GL um den Faktor 100. Die mit Hilfe von Mehrfachbestimmungen erhaltenen Werte variieren mit einer mittleren Standardabweichung von 36,8% ($x_{\min}=0,96\%$, $x_{\max}=112,03\%$). Im LightCycler konnten Standardverdünnungen bis 10^3 Kopien/ μ l spezifisch detektiert werden. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse waren bei den Patienten FI und LO neben dem Peak der spezifischen Produkte ein Peak von unspezifischen Produkten nicht nachweisbar (s. Abb. 6). Da der β -Primer für GL unspezifische Produkte mit einem Peak bei 81°C in grosser Menge bildete (s. Abb. 8, S.75), wurde die Messtemperatur auf 83°C erhöht. Keine der Negativproben zeigte ein unspezifisches Produkt (s. Abb. 5).

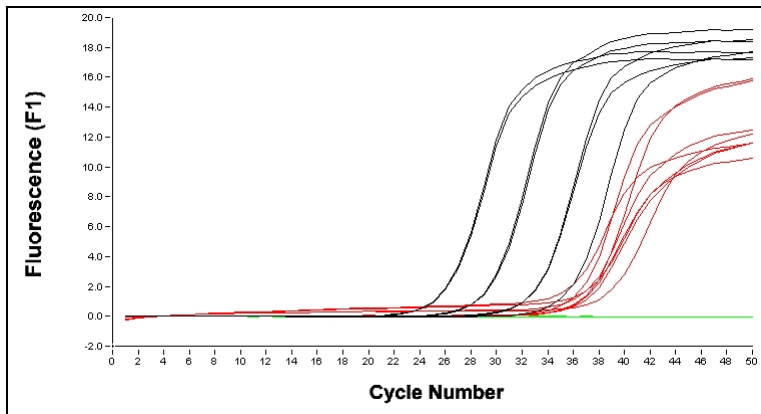


Abb. 5: Klonspezifische *Real time* –PCR Patient LO; Schwarz: Standard in zunehmender Verdünnung 1:10, mittelgrau: Blutproben LO; hellgrau: Negativproben

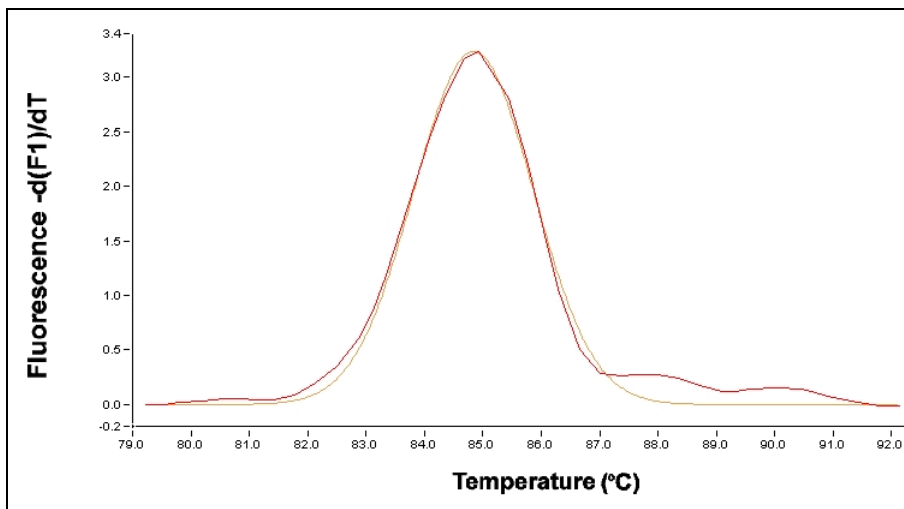


Abb. 6: Schmelzkurvenanalyse nach klonspezifischer PCR mit Blutprobe des Pat. FI im LightCycler

In 37/52 Proben stimmten die Ergebnisse der klonspezifischen PCR im Agarosegel und der LightCycler-PCR überein: In 11/52 Fällen konnte weder mittels klonspezifischer PCR und Auftrennung im Agarosegel noch mittels LightCycler-PCR, in 26/52 Blutproben konnte mit Hilfe beider Methoden die klonale Sequenz detektiert werden. In 15 Fällen divergierten die Ergebnisse zwischen beiden Methoden. Die klonale Sequenz war in 11 Blutproben trotz Nachweises mittels Agarosegels durch die LightCycler-PCR nicht detektierbar, bei diesen war im Agarosegel immer eine Produktmenge von + bis (+) sichtbar. Bei 4/52 Proben war dies umgekehrt, hier wurden mittels LightCycler-PCR

klonale Rearrangements mit einem Anteil von 0,5 bis 3,0% ermittelt (siehe Tabelle 10, 11 und 12).

Schätzt man den Anteil der klonalen Zellen im Blut semiquantitativ anhand der Bandenstärke im Agarosegel ab, stimmen 21/26 Blutproben mit den mittels Quantifizierung im LightCycler erhaltenen Daten überein, bei 5 Proben war der im LightCycler gemessene Anteil höher als im Agarosegel veranschlagt.

Tab. 13: Patient ZO, Vergleich Ergebnisse der Routine-PCR mit klonspezifischer PCR und LightCycler-Quantifizierung. (Erläuterungen siehe Tabelle 10)

Datum	Name	PCR-TGGE	Sq. TuZ	% TuZ	Verlauf	Therapie
12/97	8711	poly	(+)	0	TNM Ia	Externa
05/98	9190	mono	(+)	0	Regredienz/ Remission	Externa
10/98	9570	poly	+	0	Neue Plaques	Interferon / Bade-PUVA
11/98	10302	poly	(+)	0	Inkompl. Remission	dto
01/99	10378	poly	(+)	0	dto.	Externa
01/99	10490	poly	0	0	dto	dto
02/99	20058	mono	0	0	3 Plaques	Cortisonsalbe
03/99	20978	poly	0	0	dto	dto
04/99	347/02	poly	0	0	dto	dto
05/99	348/02	poly	0	0	Knotenbildg.	Externa

Bei Patient GL (s. Abb. 10) war der im LightCycler bestimmte Ausgangswert der zirkulierenden, klonalen Zellen 12/1997 während progredienter Erkrankung unter PUVA/Interferontherapie mit 0,8% niedrig und sank 10/1998 weiter auf 0% ab, zeitgleich mit dem Auftreten einer Lymphadenopathie. Im Anschluss kam es unter Hybridzellvakzinierung und Therapie mit extrakorporaler Photophorese und PUVA zu einem Anstieg der klonalen Zellen im Blut von 02/1999 bis 05/1999 bis auf 5,6%. Während einer MTX-induzierten Rückbildung der kutanen Tumoren 11/1999 kam es zu einem weiteren Anstieg auf 29,5%, während zum Zeitpunkt einer erneuten Progredienz 01/2000 der Anteil der klonalen Zellen auf 5,2% abfiel. Unter einer weiteren

Methotrexattherapie kam es zunächst zu einem Abfall der zirkulierenden, klonalen Zellen auf 0%, während einer kompletten, klinischen Remission 11/2000 stiegen sie auf den Maximalwert von 91% an. Bei stabiler, klinischer Remission sank der Anteil der zirkulierenden Tumorzellen im weiteren Verlauf ab, der Patient verstarb 08/2001 an einer Sepsis mit 8% klonalen Zellen im Blut.

Bei Patient LO (s. Abb. 11) zeigten zwei zum Zeitpunkt der Remission 06/1998 nach PUVA/Interferon-Therapie und 03/1999 unter PUVA-Therapie entnommene Blutproben mit 1,4 und 2,9% nur einen geringen Unterschied der zirkulierenden klonalen Zellen. Während eines erneuten Rezidivs 12/1999 war das klonale Rearrangement im Blut nicht nachweisbar. Der Anteil stieg ab 03/2000 bis 03/2001 an, im gleichen Zeitraum war die Erkrankung progredient. Eine Ausnahme bildete die Zeit der Hybridzellvakzinierung, hier kam es zur Rückbildung eines Tumorknotens und zeitgleich zum Auftreten erneuter kutaner Manifestationen, klonale Zellen im Blut waren jedoch nicht mehr nachweisbar. Ihr Anteil stieg später unter PUVA-Therapie wieder auf 4,6%. Eine komplette, klinische Remission 03/2001 und ein späteres Rezidiv 05/2001 brachten nach einer leichten Abnahme einen maximalen Anstieg auf 6,5% klonale Zellen im Blut.

Bei Patient FI (s. Abb. 12) konnten im Blut während eines Rezidivs 02/1997 keine klonalen Zellen nachgewiesen werden, während klinischer Remission unter PUVA- und Interferontherapie stieg der Anteil zirkulierender, klonaler Zellen auf 2 bzw. 1% an und blieb während der kompletten Remission 01/1998 auf diesem Niveau. Zum Zeitpunkt eines erneuten Rezidivs 07/1998 waren die klonalen Zellen wiederum im Blut nicht nachweisbar, um während einer kompletten Remission unter Steroidtherapie 11/1998 auf den Maximalwert von 9% anzusteigen und während des nächsten Rezidivs 4/1999 wieder auf 2% zu fallen. Auch während des darauffolgenden Rezidivs 12/1999 sank der Anteil der im Blut vorhandenen monoklonalen T-Zellen trotz progredienten Krankheitsbildes 04/2000, blieb aber während der folgenden Remission 04/2001 und einem Rezidiv 07/2001 auf dem gleichen Niveau.

Betrachtet man bei Patient GL (s. Tab. 11 und Abb. 10, S.83) das Absinken der Tumormasse im Blut trotz Zunahme der Hauttumoren zwischen 12/1999 und 03/2000 und das klinische Bild einer kompletten Remission trotz maximalen Anteils an klonalen

Zellen im Blut 11/2000, wird die Tendenz sichtbar, dass die Frequenz der klonalen Zellen im Blut bei Verbesserung des Hautbildes ansteigt und bei Verschlechterung absinkt. Ein weiteres Beispiel dafür ist Patient FI (s. Tab. 10 und Abb. 12, S.85), bei dem während der zwei Rezidive zu Beginn keine klonalen Zellen im Blut nachweisbar sind, während der Remissionen der Anteil der Tumorzellen aber ansteigt. Der maximale Anteil an klonalen Zellen zum Zeitpunkt einer kompletten Remission 10/1998 und ein Absinken des Anteils während des Rezidivs 04/1999 ist ein zusätzliches Beispiel. Bemerkenswert ist eine indirekte Korrelation von klinischem Bild und Anteil an zirkulierenden, klonalen Zellen nicht nur während den Phasen topischer Therapie, z.B. bei FI zwischen 07/1998 und 10/1998, sondern auch während der Applikation systemischer Therapieformen, z.B. die Chemotherapien mit MTX bei GL 09/1999 bis 12/1999 und 01/2000 bis 11/2000 und die Hybridzellvakzinierung 12/1998 bis 04/1999 beim gleichen Patienten.

Anders verhält es sich bei Patient LO (s. Tab. 12 und Abb. 11, S.84). Vergleicht man die Werte zum Zeitpunkt der kompletten Remissionen mit denen während der Rezidive, ist der Anteil der klonalen Zellen zum letztgenannten Zeitpunkt höher, was im Gegensatz zur vorher festgestellten Tendenz steht.

Werden die quantitativen Werte in Bezug zu klinischem Verlauf und Therapie gesetzt, lässt sich aber aufgrund der geringen Variation der Werte im Verlauf und der grossen Standardabweichungen höchstens eine Tendenz, jedoch keine sichere Korrelation feststellen.

3.3 TCR-Klonalität bei Patienten mit SPP

1.1.1 Nachweis klonaler Zellen in Blut- bzw. Hautproben

Von 14 Patienten mit histologisch und klinisch gesicherter SPP wurden sowohl Haut- als auch Blutproben bei Erstdiagnose und vor Therapie retrospektiv mittels TCR γ -PCR-TGGE-Assays untersucht. Bei 9/14 Patienten konnte damit im Blut ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden. In der Haut war bei keinem der Patienten Monoklonalität nachweisbar.

3.3.2 Sequenzierung und Entwicklung klonspezifischer Primer

Das monoklonale TCR γ -Rearrangement im Blut der 9 SPP-Fälle wurde sequenziert. Die N-Sequenzen aller Blutklone zeigten dabei eine mittlere Länge von 10,2 Bp ($x_{\min}= 2$

Bp, $x_{\max} = 22$ Bp), im Gegensatz zu 6,8 Basenpaaren bei den MF-Patienten. Der GC-Anteil betrug im Mittel 57,9% (Median= 57,8%; $x_{\min} = 0\%$; $x_{\max} = 100\%$).

Ein überdurchschnittlich häufiges Rearrangement wurde mit 44% für V γ 2 und mit 22 bzw. 33% für V γ 10 und 11 gesehen, V γ 11-IV wurden mit 55% häufiger als bei den MF-Patienten (13) rearrangiert (12%).

Für 6 Patienten war die Entwicklung eines N-spezifischen Primers möglich (siehe Tab. 14). Hier lag die Länge der N-Sequenzen im Mittel bei 14 Basenpaaren, der GC-Anteil bei 64,3% (Median= 61,3%, $x_{\min} = 41,6\%$, $x_{\max} = 100\%$). Für Patient BC und CZ wurde wegen einer N-Sequenz von 1 bzw. 3 Basenpaaren auf die Entwicklung eines Primers verzichtet. Die für die Patienten HL und HO entworfenen Primer waren nicht spezifisch, hier betrug die mittlere Länge der N-Sequenz 4,5 Bp, der GC-Anteil 23,1%.

3.3.3 Ergebnisse der klonspezifischen PCR in Haut- und Blutproben

Pro Patient wurden bei Erstdiagnose eine Haut- und Blutprobe und während des Follow-ups von 18 bis 47 Monaten 1 bis 8 weitere Blutproben entnommen.

Mit Hilfe der klonspezifischen Primer konnte das monoklonale Rearrangement in allen Blutproben der Patienten nachgewiesen werden. Anhand der PCR mit Konsensusprimern war dies nur in 18/20 Fällen möglich gewesen.

Bei keinem der 6 SPP-Patienten gelang es, die monoklonale Sequenz aus dem Blut auch in der Haut nachzuweisen (s. Abb. 7).

Obwohl das PCR-Produkt nochmals in einer geschachtelten PCR mit V seq und dem N-spezifischen Primer eingesetzt wurde, blieb ein Nachweis des monoklonalen Rearrangements in den Hautläsionen negativ (siehe Tab. 14).

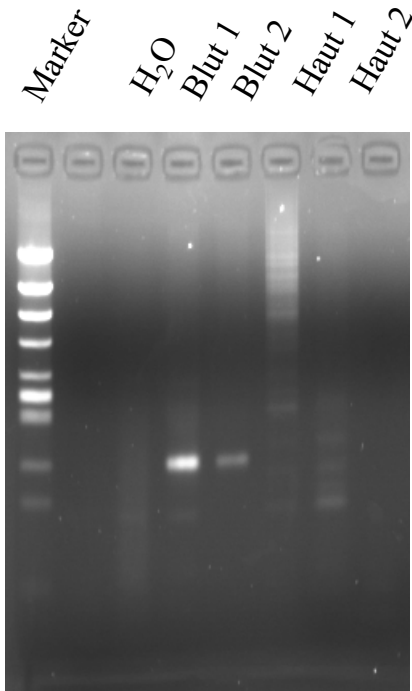


Abb. 7: PCR mit klonspez. Primer BE; Marker: Hinc III Lambda; H₂O: Negativprobe; Blut 1: diagnostische Blutprobe; Blut 2: zweite Blutprobe BE; Haut 1: Hautprobe BE; Haut 2: Hautprobe 1 nach nested PCR

Zur Beurteilung des Nachweises zirkulierender, klonaler Zellen bei SPP-Patienten ist eine Unterscheidung zwischen reaktiven und malignen Zellen notwendig. Zwar konnten in einigen MF-Fällen auch CD8⁺ Zellen als klonal proliferierend nachgewiesen werden, jedoch in der Mehrzahl der Fälle ist die maligne Zellfraktion bei MF CD4⁺ (92). Ausserdem konnte von Posnett et al. (84) die Entwicklung von Klonen bei CD8-positiven T-Zellen auch bei gesunden Probanden gezeigt werden. Deshalb wurden bei den Patienten SZ und HO die im Blut vorhandenen T-Zellen nach CD4/CD8-Expression sortiert, aus diesen Zellen DNA extrahiert und mit den klonspezifischen Primern untersucht. Bei beiden Patienten zeigte sich, dass die klonalen Zellen der CD4⁺ Fraktion zuzuordnen sind.

Tab. 14: Sequenzen und Ergebnisse der klonenspezifischen PCR der SPP-Patienten

ID	TCR γ PCR Haut Blut	klonspezifische PCR Klonale TCR γ -Sequenz und klonspezifischer Primer ^a	Annealing temp.	Blut	Haut	Haut nested ^b	CD4+ ^c CD8+ ^c	Follow-up ^d TCR γ PCR	klonspezifische PCR
1 WO	p							0/2	
2 KL	p							0/1	
3 SÖ	p							0/3	
4 WE	p							0/1	
5 SN	p							0/8	
6 CZ	p	Vg2- TGGGCAAATTA -Jg1						3/3	
7 BE	p	Vg11- GCTGGATTAGTGGGGCGAGTGGAG -Jg2 BE-1 CTAATCCACCCCGCTCAC	64°C	+	-	-		3/3	3/3
8 BC	p	Vg2- ACGGCTATA -Jg2						3/3	
9 HL	p	Vg10- GTGGGAGCIGATATTATAAGAAA -Jg1 HL-1 CTCGACTATAATATTCITT	61°C	ns				8/8	
10 HO	p	Vg2- GGGTAAAAATATTATAAGAACTC -Jg2 HO-1 CAATTTTAAATAATTCITTTGAG	61°C	ns					7/7
		Vg2- CACCCATTGAGGTAAGGGCAGT -Jg2 HO-2 TAAGTCCCGAGGCCCGTCA	60°C	++	-	+		6/7	
11 ME	p	Vg2- CAGCCCGATTATAAGAACTTTG -Jg2 ME-1 GGGTAAATTCITTTGTGAAC	60°C	+	-	-		3/4	4/4
12 RI	p	Vg11- GCTGGATTAGGCACGGGAAAGAAA -Jg2 RI-1 CTAATCCGTGCACCTTTC	62°C	++	-	-		1/1	1/1
13 SF	p	Vg10- GTGGGCCIAACCGATATACCACTG -Jg2 SF-1 GGATTGGGTATATGGTGAC	63°C	++	-	-		1/1	1/1
14 SZ	p	Vg10- GTGGGATGGGTGAGGGGCAACATT -Jg1 SZ-1 CTACCCACTCCCGTTGTAA	63°C	++	-	+		4/4	4/4
JM ^e		Vg8- GAAATTTTATTATAAGAACTCTTTGG -Jg2 JU-5 CTTTAAAAATAATTTCAAAGTG Vg11-GTCAGATCCTCACAGGGCGGTTTAAAG -Jg1	60°C						
Σ	0/14			6/9	0/6	0/6		32/49	20/20

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Validität der Ergebnisse der PCR mit Konsensusprimern und Auftrennung mittels TGGE

Die Klonalitätsdiagnostik mittels PCR spielt in der Diagnostik von CTCL-Erkrankungen zusammen mit Histologie und Klinik eine entscheidende Rolle. Wir haben Haut- bzw. Blutproben von MF- und SPP-Patienten mittels PCR und TGGE analysiert und die monoklonalen Rearrangements sequenziert.

Die Keimbahnsequenz der T-Zell-Rezeptoren umfasst 4 TCR-Ketten. Die Verwendung von für die α -Kette spezifischen Primern wäre wegen der Notwendigkeit zahlreicher PCR-Ansätze sehr aufwendig, die Verwendung von für das TCR- δ -Gen spezifischen Primern nicht möglich gewesen, da dieses während des Rearrangements der α -Gens herausgeschnitten wird (27).

Die TCR- γ -Kette dagegen besteht aus 14 V-Segmenten und 5 J-Segmenten. Die Subfamilie I (V γ 1-8) zeigt eine ausgeprägte Sequenzhomologie. Da bei einem Grossteil der MF-Patienten die T-Zellen ein klonales Rearrangement der V γ 1- und J γ 1/2-Segmente aufweisen, wählten wir zur PCR-Analyse die von Volkenandt et al. (107) für V γ 1-8 und J γ 1/2 entworfenen Konsensusprimer aus, womit 60 bis 80% der TCR- γ -Rearrangements erfasst werden. Bei polyklonalem Ergebnis wurden die Proben mittels der von Muche et al. (79) entworfenen Primer für die Segmente V γ 9-11 und J γ P1/2 untersucht.

War die Entwicklung eines klonspezifischen Primers mittels TCR- γ -PCR nicht möglich, wurden die Hautproben der MF-Patienten auch mittels TCR- β -Primern untersucht. Die TCR- β -Sequenz besteht aus 65 V-Segmenten mit 30 Subfamilien. Die von Kneba et al. (61) entwickelten degenerierten V β - Primer sind spezifisch für einen Genort mit einer Sequenzhomologie der V β -Kette von 88-100%.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der TGGE längen- und sequenzabhängig aufgetrennt.

Um falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination auszuschliessen, wurden die von uns gefundenen Sequenzen mit Sequenzen anderer Patienten und von Positivkontrollen in unserer Datenbank verglichen.

Der *sampling error* beschreibt die Tatsache, dass bei niedriger Menge an Ziel-DNA für einen Primer die Wahrscheinlichkeit wächst, dass einzelne, expandierte Rearrangements überrepräsentiert werden und zu einem falsch-positivem Ergebnis führen (71). Dies könnte eine Rolle spielen bei den für V γ 9-11 spezifischen Primern, die insgesamt nur an 20-40% der Rearrangements spezifisch binden. Auch bei der TCR- β -PCR wäre dies neben der Gefahr der Bildung unspezifischer PCR-Produkte aufgrund von zahlreichen Mismatches möglich.

Zur Erhöhung der Spezifität wurde deshalb die Identität der ermittelten V-Segmente mittels Sequenzierung überprüft.

Bei der hier verwendeten TCR- γ -PCR in Kombination mit der TGGE konnte eine Sensitivität von 0,1 – 1% in 10⁶ polyklonalen Zellen gefunden werden (69).

Neben Patienten mit CTCL wurde auch in Hautproben von Patienten mit benignen Dermatosen ein monoklonales Amplifikat gefunden (31). Im Blut wurden klonale Zellen neben Lymphompatienten auch bei Personen mit Autoimmunerkrankungen, anderen Hautkrebsarten (74) und mit erworbenen oder angeborenen CD4-Lymphozytopenien nachgewiesen (11,101). Eine Erkrankung der von uns untersuchten Patienten an einer der oben genannten Entitäten wurde durch histologische und klinische Untersuchung ausgeschlossen. Trotzdem zeigt dies, dass der Nachweis von Monoklonalität nicht zwingend das Vorhandensein neoplastischer Zellen bedeutet. Umgekehrt stellt sich die Frage, ob die maligne entarteten Zellen bei CTCL klonal proliferieren. Einen Hinweis gibt der Nachweis oligo- und später monoklonaler Zellen während der Entwicklung eines CTCL (55,72). Des Weiteren konnten bei klonalen Zellen klonale, chromosomale Aberrationen gesehen werden (78), was die Tatsache untermauert, dass die malignen Zellen klonal wachsen.

4.1.2 Validität der quantitativen PCR

4.1.2.1 Sensitivität und Spezifität der klonspezifischen PCR

Klonspezifische Primer wurden zuerst bei Patienten mit T-ALL zum Nachweis der *minimal residual disease* von Tycko et al. (103) entwickelt. Die Methode wurde

später von Volkenandt et al. (106) zum Nachweis klonaler Zellen bei CTCL-Patienten übernommen.

Durch Bindung der Primer an unspezifische Bindungsstellen und die Bildung von Primer-Dimern und Haarnadelstrukturen können unspezifische PCR-Produkte entstehen.

Mit Hilfe der OLIGO-Software wurden die Primer so entworfen, dass deren 3'-Ende an die N-Sequenz binden konnte, aber keine Primer-Dimer, Haarnadelstrukturen oder unspezifische Bindungen mit Beteiligung des 3'-Endes gebildet wurden. War dies aufgrund der Kürze der N-Sequenz nicht möglich, wurde mittels Veränderung von $MgCl_2$ -Konzentration und Annealingtemperatur versucht, die Bildung unspezifischer Produkte zu verhindern.

In den in der Literatur existierenden Studien zur Anwendung klonspezifischer TCR- γ -Primer (105,107) zeigte sich, dass die Spezifität häufig nicht ausreichend hoch ist. Als Ursache werden die zu geringe Länge der N-Sequenz der TCR- γ -Kette und die Interferenz mit dem polyklonalen Hintergrund aufgrund der hohen Sequenzhomologie der V- und -J-Segmente genannt (34,105,107). Auch uns war aufgrund der geringen Länge der N-Sequenz nur bei wenigen Patienten die Entwicklung eines klonspezifischen TCR- γ -Primers möglich.

Wir haben 50 TCR- γ -Sequenzen bestimmt, bei denen wir eine mittlere Länge der N-Sequenz von 6,4 Bp fanden. Aufgrund einer Länge von 0-2 Basenpaaren wurde bei 11 Sequenzen auf die Entwicklung eines klonspezifischen Primers verzichtet.

Für 24 der übrigen Sequenzen war die Entwicklung eines spezifischen Primers nicht möglich. Dabei war für 5 Sequenzen die Entwicklung eines klonspezifischen Primers wegen Schmelztemperaturunterschieden grösser $10^\circ C$ zwischen diesem und dem V-Primer, für 3 wegen der Bildung von Primer-Dimern mit zu hoher Stabilität und für eine Sequenz wegen falscher Bindungsstellen des klonspezifischen Primers unmöglich. 7 Sequenzen, für die die Entwicklung eines klonspezifischen Primers nicht gelang, hatten eine N-Sequenz-Länge von 3 bis 5 Basenpaaren. Die minimale Länge der N-Sequenz, für die ein Primer entwickelt werden konnte, betrug 5 Basenpaare. Die Studien von Volkenandt und Tycko (103,107) nennen mit 6 Basenpaaren ähnliche Zahlen, Nakao et al. (81) berichten dagegen von N-Sequenzen mit einer Länge von 3 Bp, für die klonspezifische Primer entworfen wurden, was hier nicht nachvollziehbar war.

Vergleicht man die Sequenzen, für die die Entwicklung eines klonspezifischen Primers möglich war, mit den übrigen, fällt ein Unterschied der mittleren Länge der N-Sequenz von 11,2 gegenüber 6,5 Basenpaaren auf. Für die Spezifität der Primerbindung ist eine Häufung von Adenosin und Thymin am 3'-Ende des Primers vorteilhaft. Betrachtet man den GC-Anteil der N-Sequenzen, war der Wert der Sequenzen mit klonspezifischem Primer sogar höher als bei den übrigen. Aufgrund der Kürze der N-Sequenz war jedoch die Entwicklung eines Primers mit einem hohen AT-Anteil am 3'-Ende und GC-Anteil am 5'-Ende nicht immer möglich. Die von uns entworfenen TCR- γ -Primer besaßen am 3'-Ende einen AT-Anteil von durchschnittlich 60%, die TCR- β -Primer von 37%. Je länger die N-Sequenz ist, umso eher ist also die Entwicklung eines klonspezifischen Primers mit einer Häufung von Adenosin und Thymin am 3'-Ende möglich.

Bei den MF-Patienten war aufgrund einer mittleren N-Sequenzlänge von 6,4 Bp nur für 15 TCR- γ -Sequenzen die Entwicklung eines klonspezifischen Primers möglich. Für die SPP-Patienten konnte dagegen aufgrund einer durchschnittlich längeren N-Sequenz von 10,2 Bp für 6 von 9 TCR- γ -Sequenzen ein patientenspezifischer Primer entworfen werden.

Eine Alternative zu den TCR- γ -Primern bildete die Entwicklung klonspezifischer Primer für die TCR- β -Sequenz. Aufgrund der durchschnittlichen Länge der N-Sequenz von 14 Basenpaaren war für 5 von 7 TCR- β -Sequenzen das Design eines Primers möglich. Einen Nachteil gegenüber der TCR- γ -PCR stellt die Notwendigkeit der Durchführung einer *nested* PCR im Rahmen der TCR- β -PCR mit Konsensusprimern vor Sequenzierung dar. Ein weiteres Problem zeigte sich bei der TCR- β -PCR von Hautproben. Aufgrund der geringen Spezifität der TCR- β -Primer ist dazu der Einsatz von DNA hoher Qualität notwendig, deren Gewinnung aus Paraffinschnitten schwierig ist.

Die klonspezifischen Primer wurden mittels Amplifikation polyklonaler Proben anderer Patienten getestet. Die PCR-Bedingungen wurden schrittweise so verändert, bis nur in der monoklonalen Probe ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge sichtbar blieb.

Zur Prüfung der Spezifität wurde von den Patienten BÄ und ZO PCR-Produkt kloniert. Die dadurch gewonnene DNA jedes Klons wurde in zwei Fraktionen aliquotiert. Eine Fraktion wurde in einer klonspezifischen PCR mit dem für Patient ZO klonspezifischen Primer Z11 eingesetzt, das Ergebnis wurde mittels Sequenzierung

der anderen Fraktion überprüft (s. Tab. 9, S.52). In 18/20, d.h. 90 % der Fälle, stimmten die Ergebnisse der klonspezifischen PCR mit den aufgrund der Sequenzierung erwarteten Rearrangements überein. 2/20 Ergebnisse waren falsch positiv. Eine Erklärung dafür könnte eine Kontamination mit dem klonalen Rearrangement aus der ZO-Probe oder die Entstehung eines unspezifischen Produktes aufgrund der hohen Sequenzhomologie der TCR- γ -Sequenz sein. Dies bedeutet, dass mit den klonspezifischen Primern zwar falsch-positive aber keine falsch-negativen Ergebnisse bis zum Sensitivitätslimit der Primer zu erwarten sind.

Durch Einsatz von DNA aus einer Verdünnungsreihe von Jurkat-Zellen in PBMC eines gesunden Probanden wurde die Sensitivität der klonspezifischen PCR untersucht. Mit Hilfe des klonspezifischen Primers Ju3 war die Detektion von 10 Kopien des gesuchten Rearrangements vor einem Hintergrund von 10^6 polyklonalen Rearrangements möglich. Tycko et al. (103) fanden eine Sensitivität von 1 monoklonaler Zelle in 10^5 bis 10^6 polyklonalen Zellen verdünnt, womit die von uns gefundene Nachweisgrenze im Bereich der in der Literatur angegebenen Sensitivitäten liegt. Eine Untersuchung klonspezifischer Primer mit Hilfe der TaqMan-Probe durch van der Velden et al. (105) zeigte, dass die Sensitivität der Primer nicht vom verwendeten V γ -Segment, sondern von der Länge der N-Sequenz und der Zahl der deletierten Nukleotide und damit auch von der Spezifität des Primers abhängt.

Eine praktische Begrenzung der Sensitivitätsprüfung liegt darin, dass in einem PCR-Ansatz die DNA von maximal 10^5 Zellen, d.h. ca. 0,4 bis 0,5 μ g DNA eingesetzt werden kann. Soll eine monoklonale Zelle in 10^6 polyklonalen Zellen nachgewiesen werden, wäre pro zehn Ansätzen höchstens eine Zelle im PCR-Ansatz. Da die Anwesenheit geringer Kopienzahlen einer Poisson-Verteilung unterliegt, beträgt nach Berechnungen Wangs et al. (109) ausserdem die Wahrscheinlichkeit nur 36,8%, dass die DNA von einer Zelle in dem Ansatz vorhanden ist. Es müssten also mindestens 30 PCR-Ansätze angefertigt werden, um die Anwesenheit einer klonalen Zelle im PCR-Ansatz sicherzustellen. Hinzu kommen Fehlermöglichkeiten bei der Erstellung einer Verdünnungsreihe. Die ermittelte Sensitivität war also auch aus technischen Gründen limitiert.

4.1.3 Validität der quantitativen PCR

Von MF-Patienten, für deren klonales Rearrangement ein klonspezifischer Primer entwickelt werden konnte und von denen mehr als 5 Blutproben vorhanden waren,

wurde die Frequenz der klonalen Rearrangements im Blut im Verlauf mittels LightCycler untersucht. Zur Quantifizierung wurde der an doppelsträngige DNA bindende Farbstoff SYBR-Green I verwendet.

Nach Einstellen aller Blutproben auf die gleiche Menge pro μl DNA eingesetzte T-Zellrearrangements, wurde der Anteil der klonalen DNA mittels klonspezifischer Primer bestimmt.

In der ersten PCR-Runde wurden die Primer Vcons und Jcons verwendet, die an Rearrangements der V γ I- und J γ 1/2-Familien spezifisch binden. Durch die Amplifikation von 60-80% der Rearrangements konnte damit der maximale Anteil der T-Zellrearrangements erfasst werden. Da es um die Bestimmung der Grössenordnung im Zehnerpotenzbereich ging, erschienen uns die 20-40% nicht detektierten Rearrangements vernachlässigbar. Einen Sonderfall stellt der Patient FI dar, dessen klonales T-Zellrearrangement nicht J γ 1/2, sondern J γ P2 beinhaltet. Die Annahme, dass 60-80% aller T-Zellen V γ I/J γ 1/2 rearrangieren, ist nur richtig, solange die Menge V γ I-J γ 1/2 rearrangierender Zellen viel grösser als die Zahl der klonalen Zellen ist. Bei diesem Patienten betrug der Anteil der klonalen Rearrangements maximal 9%, d.h. die Zahl der klonalen Zellen hat die Gesamtzahl der T-Zellen nur um maximal 9% erhöht, was uns vernachlässigbar erschien.

4.1.3.1 Wahl der Quantifizierungsmethode

Der Verlauf einer PCR kann in 3 Phasen unterteilt werden: Der lag-Phase, in der das durch das PCR-Produkt erzeugte Fluoreszenzsignal kleiner als das „Hintergrundsignal“ der PCR-Reagenzien ohne DNA-Einsatz ist, folgt die log-Phase, während derer die DNA exponentiell vervielfältigt wird. Anschliessend geht die PCR in die Plateauphase über, in der die Menge des PCR-Produkts nicht weiter zunimmt. Von der Produktmenge kann nur auf die eingesetzte DNA-Menge geschlossen werden, falls die Effizienz (E) konstant bleibt. Dies ist nur während der log-Phase der Fall. Beim Übergang in die Plateauphase nimmt E ab, eine Quantifizierung ist nicht mehr möglich. Die Zahl der Zyklen, nach denen die PCR in die Plateauphase übergeht, ist abhängig von der DNA-Konzentration und der Menge der PCR-

Reagenzien. Die Zyklenzahl, in denen sich die PCR in der log-Phase befindet, wird auf 4-10 geschätzt (87).

Mittels Auftrennung des PCR-Produktes bei einer Endpunkt-PCR im Agarosegel ist allenfalls eine semiquantitative Abschätzung der PCR-Produktmenge möglich. Vorteile sind die technische Einfachheit und der geringe Zeitaufwand, Nachteile die niedrige Validität durch eine hohe Untersucherabhängigkeit. Da die PCR in der Plateauphase beendet wird, ist ausserdem die Vergleichbarkeit von zwei Produktmengen nicht gewährleistet. Zur Beendigung in der log-Phase wären mehrere PCR-Ansätze mit verschiedener Zyklenzahl notwendig.

Bei der kompetitiven PCR wird neben der Proben-DNA eine um Primer und PCR-Reagenzien konkurrierende Standard-DNA eingesetzt. Beide DNA besitzen die gleiche Primerbindungsstelle, können aber mittels Unterschieden in der Sequenz oder Länge getrennt werden. Nur wenn sich im Ansatz gleiche Mengen an Standard und Proben-DNA bei gleich effizienter PCR befinden, entsteht gleich viel Produkt und die beiden in einer Gelelektrophorese ermittelten Banden sind gleich stark. Bei dieser Methode spielen *tube-to-tube* und *sample-to-sample* Differenzen keine Rolle. Das Verhältnis zwischen Proben- und Standard-DNA bleibt auch nach Erreichen der Plateauphase konstant bei gleichzeitigem Anstieg der Sensitivität (85). Ein Nachteil ist die Notwendigkeit mehrerer PCR-Ansätze mit einer Standardverdünnungsreihe zur Ermittlung des Äquivalenzpunktes beider DNA und die Weiterverarbeitung mittels Gelelektrophorese (89).

Im LightCycler ermöglicht die Messung der Menge doppelsträngiger DNA nach jedem Zyklus in einem PCR-Lauf die Aufzeichnung der DNA-Menge abhängig von der Zyklenzahl. Betrachtet man die log-Phase dieser Kurve, kann mit Hilfe eines Standards auf die eingesetzte DNA-Menge geschlossen werden.

Wir entschieden uns für diese Methode, da sie zwar gegenüber der kompetitiven PCR kostenintensiver, jedoch weniger zeitaufwendig ist, da sie nicht mehrere PCR-Ansätze benötigt, was den DNA-Verbrauch limitiert. Damit ist ein höherer Probendurchlauf möglich, eine Weiterverarbeitung des Produkts nach der PCR ist nicht notwendig.

Wird DNA mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eines externen Standards quantifiziert, gilt für DNA und Standard die Gleichung $N=N_0 \cdot (E)^n$, wobei N die Produktmenge, N_0 die Menge eingesetzter DNA, E die Effizienz und n die Zyklenzahl ist. Leichte Abweichungen der Effizienzen der Standard- und Ziel-DNA können eine starke

Verfälschung des quantitativen Ergebnisses bewirken. Beträgt die Differenz z.B. 0,1 bei einer Standardeffizienz von 1,9, so führt dies nach 25 Zyklen zu einer 3,6-fachen Unterschätzung der Menge der Ziel-DNA (87).

Wir verwendeten als Standard mittels klonspezifischer PCR hergestellte DNA, die aufgrund der gleichen Sequenz theoretisch mit der gleichen Effizienz amplifiziert wird. Um Unterschiede zwischen den Proben aufgrund von Effizienzbeeinträchtigungen durch PCR-Inhibitoren oder unterschiedliche DNA-Qualität auszuschliessen, wurde die Effizienz von Standard und Ziel-DNA mittels Verdünnungsreihen getestet nach der oben genannten Gleichung $N=N_0 \cdot E^n$. Die Effizienzunterschiede lagen bei 0,035 bis 0,05, was theoretisch bei 35 Zyklen eine ca. 3-fache Mengendifferenz zwischen Standard und DNA bewirkte.

Eckert et al. (37) untersuchten mittels TCR- δ -PCR Blutproben von ALL-Patienten und beurteilten den SYBR Green I-Farbstoff als für die Quantifizierung ungeeignet, da der Farbstoff auch an unspezifische PCR-Produkte bindet. In der Negativprobe wurde ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen, das nicht wesentlich niedriger als in den Proben war.

Neben dem Einsatz einer optimierten, klonspezifischen PCR umgingen wir dieses Problem durch die Wahl der Messtemperatur. Aufgrund verschiedener Länge und Sequenz weisen unspezifische Produkte von der Ziel-DNA verschiedene Schmelztemperaturen auf, wobei die der erstgenannten meist geringer ist. Die Schmelzkurvenanalyse, in der die Schmelztemperatur der Produkte als unterschiedliche

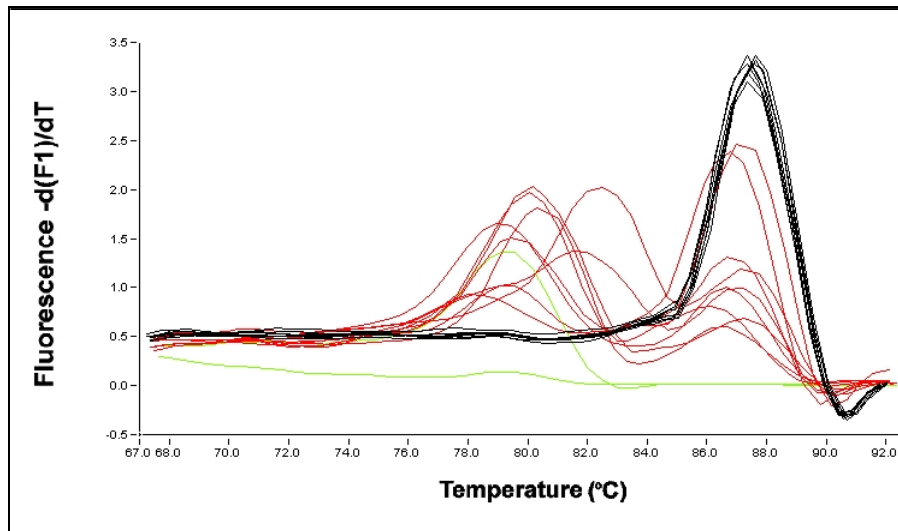


Abb. 8: Schmelzkurvenanalyse real time-PCR Patient GL; Schwarz: Standard; Rot: Blutproben; Grün: Negativprobe; Die Blutproben haben einen zweiten Peak bei ca. 81°C.

Peaks zu unterscheiden sind, zeigte, dass die Menge unspezifischer Produkte bei einer von uns gewählten Messtemperatur von 79°C vernachlässigbar ist. Eine Ausnahme bildete der GL b-Primer, durch den unspezifische Produkte mit einer Schmelztemperatur von 81°C gebildet wurden (s Abb. 8). Die Messtemperatur wurde zur Verbesserung der Sequenzspezifität auf 83°C erhöht, hier lagen die unspezifischen Produkte bereits als einzelsträngige DNA vor (s.Abb. 9). Bei diesem Vorgehen konnte in den Negativproben in keinem der PCR-Ansätze am Messpunkt ein signifikantes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden.

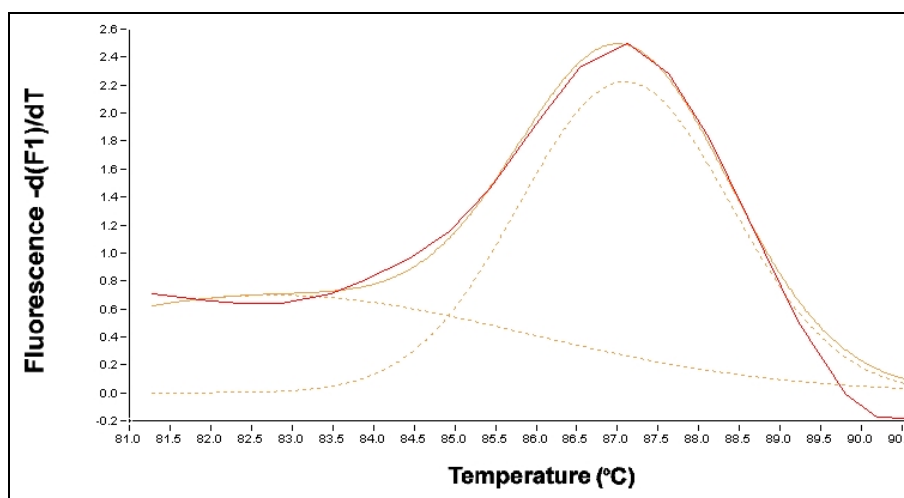


Abb. 9: Schmelzkurvenanalyse Real time-PCR Blutprobe GL: Der zweite Schmelzkurvenpeak ist bei einer niedrigeren Temperatur als 83°C

Eine Alternative zu SYBR Green I ist der Einsatz eines spezifischen Oligonukleotids als Hybridisationsprobe. Kommt es zur Bindung zweier mit Fluoreszein markierter Hybridisationsproben an der DNA nebeneinander, entsteht ein sequenzspezifisches Signal (87). Würde der klonspezifische Primer als Hybridisationsprobe mit einem Farbstoff markiert, müsste in unserem Fall die andere Probe innerhalb des V-Segments platziert werden.

Das TaqMan-System ist ein dem LightCycler entsprechendes System der Firma Applied Biosystems. Eine sogenannte TaqMan-Probe, die sich an der DNA zwischen den beiden Primern anlagert, ist mit einem Fluoreszein- und einem Quencher markiert. Im TaqMan-System wird das Signal erfasst, das durch Hydrolyse des Fluoreszenzfarbstoffs mittels Taq-Polymerase während der PCR entsteht. Da sowohl TaqMan- als auch Hybridisationsprobe an einer konservierten V-Sequenz binden müssen, wäre dies zwar aufgrund einer hohen Sequenzhomologie für die TCR- γ -Sequenz möglich, für die β -Sequenz jedoch wäre aufgrund der geringen Homologie (94) das Design einer Probe für jedes V β -Segment notwendig. Dies wäre nur bei einem hohen Probendurchsatz rentabel. Für uns wäre sie aufgrund der geringen Zahl der zu untersuchenden Proben aber zu kostenintensiv und aufwendig. Ein weiteres Problem wäre das der Bezugsgrösse für alle TCR- β -Rearrangements, da es keinen TCR- β -Primer gibt, der einen Grossteil aller Rearrangements amplifiziert.

Mittels unterschiedlicher Methoden wird der Crossing-point der Amplifikationskurve C_p bestimmt. Wir verwendeten die *second derivate maximum*-Methode, da sie gegenüber der *fit point*-Methode untersucherunabhängig ist. Mit Hilfe der Crossing-points der Standardverdünnungsreihe ist die Erstellung einer Standardkurve möglich, mit deren Hilfe auf die Konzentration der Proben geschlossen werden kann und deren Validität mit der Anzahl der Messpunkte wächst. Es muss also ein Mittelweg zwischen genügender Validität und ausreichendem Probendurchsatz gefunden werden, da im LightCycler nur 32 Ansätze Platz finden. Wir setzten den Standard in 3-4 Zehnerverdünnungsstufen ein, eine Zahl, die mit der von Rasmussen (87) empfohlenen Mindestanzahl übereinstimmt. Wichtig für die Genauigkeit der Quantifizierung ist ausserdem, dass die Menge der Ziel-DNA grösser als die in der grössten Standardverdünnung enthaltene ist. Da sich die Konzentration der Ziel-DNA nahe der Detektionsgrenze des LightCyclers befand, war der Einsatz grösserer Standardverdünnungen nicht möglich.

4.1.3.2 Validität der Quantifizierung

Um die Validität der Quantifizierungsergebnisse zu erhöhen, wurden alle Messwerte 2- bis 4-fach bestimmt. Zu stark abweichende Werte wurden aus der Messung herausgenommen und wiederholt. Der Variationskoeffizient, der Quotient aus Standardabweichung und algorithmischem Mittel der Messwerte betrug im Mittel 36,8% mit einem Maximalwert von 110%.

Liegt das Quantifizierungsergebnis einer Unbekannten ausserhalb des Konfidenzintervalls K einer bekannten Probe mit K gleich der 3-fachen Standardabweichung, handelt es sich bei beiden mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit um unterschiedliche Proben. Das Konfidenzintervall unserer Ergebnisse beträgt im Durchschnitt 110,8% des Mittelwertes, so dass Proben mit einer grösser als Faktor 2,2 betragenden Konzentrationsdifferenz unterschieden werden konnten. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen Rasmussens (87), die Proben mit einer Konzentrationsdifferenz vom Faktor 2 unterscheiden konnte.

Werden niedrige DNA-Mengen eingesetzt, variieren die Quantifizierungsergebnisse auch aufgrund statistischer Schwankungen. Die Amplifikation eines Moleküls kann nur in zwei Extremsituationen mit Sicherheit vorausgesagt werden: Beträgt die PCR-Effizienz 1, kommt es zu keiner Amplifikation, beträgt sie 2, kommt es zu einer Verdoppelung der Ausgangsmenge. Liegt die Effizienz der PCR zwischen 1 und 2, ist die Vorhersage über die Amplifikation eines Moleküls nur mit statistischer Wahrscheinlichkeit möglich. Ist die DNA-Menge gross, kann dies vernachlässigt werden, da das Gesetz der grossen Zahlen gilt. Die Varianz aufgrund statistischer Überlegungen ist dagegen bei niedrigen DNA-Mengen ausgeprägter. Die Arbeitsgruppen um Rasmussen (87) und Peccoud (83) fanden bei 10 000 Kopien/Ansatz einen Variationskoeffizienten von 6,4, bei 100 dagegen von 18%. Je niedriger die eingesetzte DNA-Menge ist, umso grösser ist also das Konfidenzintervall. Da von uns ca. 2000 Kopien pro Ansatz eingesetzt wurden, beträgt der Variationskoeffizient ca. 10%, wodurch die Varianz zumindest teilweise erklärt werden kann. Eine weitere Ursache für die Varianz der Werte könnte in Pipettierungenauigkeiten liegen. Da die Menge der Ziel-DNA mit 1000 Kopien/ μ l klein ist, können geringe Abweichungen der Ausgangsmenge bereits grosse Schwankungen der Produktmenge bewirken.

4.1.3.3 Korrelation zwischen klonspezifischer PCR und Auftrennung mittels Agarosegels und PCR im LightCycler

Vergleicht man die Ergebnisse der klonspezifischen PCR nach Auftrennung im Agarosegel und nach Amplifikation im LightCycler, konnte mit Hilfe des LightCyclers in 8/42 Fällen keine monoklonale DNA trotz eines positiven Ergebnisses durch PCR und Agarosegel nachgewiesen werden. In 6/42 Fällen war dies umgekehrt. Eine Erklärung für den ersten Fall könnte eine niedrigere Sensitivität der LightCycler-Methode sein (46). Die begrenzt einsetzbare DNA-Menge aufgrund eines Gesamtvolumens von 20µl pro PCR-Ansatz wird als möglicher Grund dafür angeführt (81). Dies könnte auch den fehlenden Nachweis des klonalen Rearrangements mittels LightCyclers trotz schwacher monoklonaler Banden im Agarosegel aus Blutproben des Patienten ZO begründen. Eine weitere Erklärung dafür könnten falsch-positive Ergebnisse im Agarosegel sein, die aufgrund der stringenteren Bedingungen im LightCycler vermieden werden konnten. Die 6/42 Fälle, die gegenüber einem positiven Ergebnis mittels PCR im LightCycler ein negatives Ergebnis mittels PCR und Agarosegel zeigten, könnten durch die Detektion durch unspezifische Produkte verursachte Fluoreszenzsignale im LightCycler erklärt werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der Sequenzierungsergebnisse

Von 47 Patienten, die klinisch und histologisch gesichert an einer Mycosis fungoides erkrankt waren, wurden 50 TCR- γ - und 6 TCR- β -Sequenzen analysiert. Die mittlere Länge der N-Sequenz der γ -Sequenzen betrug 6,8 bei MF-Patienten, die der β -Sequenzen 14 Basenpaare. Die Länge der γ -Sequenzen ist etwas grösser als die von Breit et al. (18) gefundene mittlere Länge von 4,6 Bp bei Gesunden, für die β -Sequenzen stimmen unsere mit den Ergebnissen Rowens et al. (94) überein. Überdurchschnittlich häufig wurden beim Rearrangement der TCR- γ -Ketten mit 48 bzw. 18% die Segmente V γ 2 und V γ 8 verwendet, bei der TCR- β -Kette V β 13 mit 42,8%. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Breit et al. (16), der eine überdurchschnittlich häufige Verwendung von V γ 3- und V γ 8-Segmenten während des Rearrangements bei T-ALL fand, und zu denen Lukowskys et al. (69), der aus der V γ 1-Subfamilie ausschliesslich Rearrangements von V γ 2 und V γ 8 sah. Als Erklärung der von uns gesehenen Bevorzugung der V γ 2- und -8-Ketten beim Rearrangement wäre eine effizientere Bindung des V γ -Konsensusprimers denkbar, was jedoch aufgrund der gleichen Spezifität für alle Gensegmente unwahrscheinlich ist.

In 84 % der untersuchten Hautbiopate wurde ein Rearrangement von V γ 1 und J γ 1/2 gefunden, Zahlen, die im Einklang mit Werten von 80-90% in zuvor publizierten Arbeiten stehen (13). Die Verwendung der für V γ 1- und J γ 1/2 spezifischen Konsensusprimern als Screeningtests in der Diagnostik von Mycosis fungoides ist also ausreichend. Nur bei einem negativen Ergebnis der Konsensus-PCR suchten wir nach einem klonalen TCR- γ -Rearrangement in V γ II-IV oder J γ P1/2, die in 12 bzw. 8% gesehen wurden. Die tatsächliche Frequenz der Rearrangements von V γ II-IV oder J γ P1/2 ist vermutlich höher, da der TCR- γ -Locus auf beiden Allelen rearrangiert werden kann, ein Rearrangement auf dem zweiten Allel aber hier nicht untersucht wurde.

V γ 1 und V γ 6 werden nicht rearrangiert, V γ 5 und V γ 7 gelten als Pseudogene, besitzen aber eine intakte Rekombinase-Erkennungssequenz (34). Mit den von uns verwendeten Primern wurde in 3 Hautbiopaten (6%) ein monoklonales Amplifikat der V γ 5-, in 2 (4%) der V γ 7-Sequenz eruiert (s. Abbildung 3). Ein Rearrangement der beiden Pseudogene wurde auch von anderen Autoren in Hautbiopaten sowohl von an anderen CTCL Erkrankten als auch MF-Patienten gesehen (14).

Wir ermittelten des Weiteren in 8% der Fälle ein Rearrangement der Pseudogene JyP1/2. Andere Autoren entdeckten mit 1-10,7% vergleichbare Frequenzen (13,69).

4.2.2 Diskussion der Diskrepanz der Ergebnisse zwischen Konsensus-PCR mit TGGE und klonspezifischer PCR

Mit Hilfe der PCR mit Konsensusprimern und der Auftrennung mittels TGGE konnte nur in 6/52 Blutproben ein monoklonales Amplifikat nachgewiesen werden, mit den klonspezifischen Primern dagegen war dies in 39 Fällen möglich. Eine Erklärung für die gefundene Diskrepanz liegt in der um 2 bis 3 Zehnerpotenzen niedrigere Sensitivität der Konsensusprimer (98). Dass der Nachweis klonaler Zellen im Blut mittels Konsensusprimern seltener als in vergleichbaren Untersuchungen (41,75) gelang, könnte an der Tatsache liegen, dass es sich dabei um mehrere Blutproben der gleichen Patienten handelte und die Zahl der Probanden mit 4 Patienten niedrig war.

Die Tatsache, dass im zeitlichen Verlauf mittels PCR und TGGE immer wieder monoklonale mit polyklonalen Ergebnisse abwechseln, legt ausserdem den Schluss nahe, dass sich die Konzentration der klonalen Zellen bei MF-Patienten in der Nähe des TGGE-Detektionslimits von 1% befindet und im zeitlichen Verlauf variiert.

Die Arbeitsgruppen um Merlio (12), Wechsler (29) und Muche (74) haben den Zusammenhang zwischen Krankheitsprogredienz und Monoklonalität untersucht. Die Arbeitsgruppe um Muche (74) fand eine schlechtere Prognose nur bei Patienten mit höherem Alter und bei gleichzeitigem Nachweis eines monoklonalen Amplifikats in Blut- und Hautprobe. Der Nachweis des monoklonalen Rearrangements aus der Haut in 39/52 Blutproben von MF-Patienten zeigt, dass der fehlende Nachweis von monoklonalen Zellen mittels Konsensus-PCR und TGGE bzw. DGGE auf die mangelnde Sensitivität der Methode zurückzuführen ist und nicht bedeutet, dass sich keine klonalen Zellen im Blut befinden.

Mittels Immunophänotypisierung wurden die bei der MF klonal proliferierenden Zellen als *skin homing* -Zellen identifiziert (92). Diese zirkulieren von der Haut über die Lymphknoten ins Blut und wieder in die Haut, eine Annahme, die durch den Nachweis klonaler Rearrangements in einem hohen Anteil der Blutproben untermauert wird. Ein negatives Ergebnis mittels Konsensusprimer-PCR und DGGE oder TGGE bedeutet also nicht, dass keine klonalen Zellen vorhanden sind, sondern

nur, dass der Anteil der klonalen Zellen niedriger als das Detektionslimit der Methode ist.

Eine Hilfe bei der Interpretation des Nachweises klonaler Zellen aus der Haut im Blut von MF-Patienten liefert das Konzept der Minimal-residual-disease bei Patienten mit ALL. Man nimmt an, dass während der ALL-Therapie die zirkulierenden, malignen Zellen nicht eradiziert werden können. Bei ALL-Patienten wurde ein Zusammenhang zwischen der Prognose und der Menge zirkulierender, klonaler Zellen gefunden (34). Der fehlende Nachweis des monoklonalen Rearrangements aus der Haut durch die klonenspezifische PCR in 13/52 Blutproben wäre durch eine Konzentration der klonalen Zellen unterhalb des Detektionslimits der Methode zu erklären. Auch das Nichtvorhandensein klonaler Zellen im Blut wäre möglich, stünde aber im Widerspruch zum vorher postulierten biologischen Verhalten der klonalen Zellen.

Desweiteren weist der Nachweis des monoklonalen Zellen aus der Haut in den Blutproben auf eine Persistenz des klonalen Rearrangements im Verlauf der MF-Erkrankung hin. Kaltoft et al. (55) beschreiben die Entwicklung monoklonaler, maligner Zellen, die über oligoklonale aus gentraumatisierten, polyklonalen Zellen entstehen. Im Krankheitsverlauf wäre die Entwicklung eines Subklons denkbar, numerische und strukturelle Chromosomenveränderungen gehen mit dem Übergang in malignere Entitäten mit einer schnelleren Progredienz und Therapieresistenz einher. Kaltoft et al. (55) wiesen chromosomale Veränderungen bei in vitro gewachsenen CTCL-Zellen nach, Karenko et al. (57) konnten bei 6 von 7 Patienten mit Sezary-Syndrom mittels komparativer Genomhybridisierung (CGH) zeigen, dass das T-Zellrearrangement von den Veränderungen nicht betroffen war. Vega et al. (104) dagegen fanden mittels PCR bei 8/39 MF-Patienten neue TCR-Rearrangements. Mit Hilfe der klonenspezifischen PCR wäre der Nachweis oligoklonaler Subklone oder von Mutationen im Verlauf nicht möglich.

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse der Quantifizierung

Wir haben bei 3 MF-Patienten mit Hilfe des LightCyclers die Frequenz der zirkulierenden, klonalen Zellen eruiert. Dabei fällt auf, dass sich die Frequenz der im

Blut zirkulierenden klonalen Zellen im Lauf der Erkrankung verändert, bei den Patienten LO und FI schwankte sie zwischen nicht-nachweisbar und 8,8% bei einem niedrigsten Wert von 0,9 Prozent, also um eine Zehnerpotenz.

Bei Patient GL variierte sie um den Faktor 100 zwischen 0,8 und 91,1%. Die Krankheit dieses Patienten befand sich im Tumorstadium und die bei ihm gefundene hohe Frequenz klonaler Rearrangements im Blut steht im Einklang mit einem von anderen Autoren mittels PCR und Southern-Blot gefundenen hohen Anteil bei der Untersuchung von Blutproben von Patienten mit fortgeschrittener MF (29, 69).

Setzt man die quantitativen Daten unter Berücksichtigung der Varianz in Beziehung zu Klinik und Therapie, so gibt es weder eine Korrelation zwischen den quantitativen Daten mit der Klinik noch mit der Therapie.

Es gab Messpunkte, zu denen die Frequenz der klonalen Zellen im Blut trotz sich modifizierter Klinik nur wenig änderte. Ein Beispiel waren die nur leicht angestiegenen Werte zwischen der Remission 06/98 und einem Rezidiv 3/99 bei Patient GL (s. Abb. 10). Eine ähnliche Situation war bei Patient FI (s. Abb. 12) zwischen der Remission 04/01 und einem Rezidiv 07/01 zu beobachten.

Umgekehrt war zu beobachten, dass sich eine Veränderung des Anteils klonaler Zellen im Blut nicht unbedingt auf die Klinik auswirkte. Ein beeindruckendes Beispiel war bei Patient GL die Abnahme der klonalen T-Zellen im Blut von 91,1% 11/00 auf 21% 01/01 während der andauernden, kompletten, klinischen Remission.

Besonders bei den Patienten GL und FI fällt jedoch die Tendenz eines reziproken Zusammenhangs zwischen dem Anteil der klonalen T-Zellen im Blut und der Klinik auf. Bei GL war im Blut 10/98 kein klonales Rearrangement mehr nachweisbar zu einem Zeitpunkt, zu dem klinisch ein vergrößerter Lymphknoten tastbar war. Die gleiche Situation stellte sich bei FI dar, wo während der Rezidive 02/97 und 7/98 kein klonales Amplifikat im Blut detektiert werden konnte. Umgekehrt stieg beim gleichen Patienten der Anteil klonaler Rearrangements 11/98 während der unter Steroidtherapie erreichten Remission auf den für ihn maximalen Wert von 9% an, eine Entwicklung, die auch bei GL zu beobachten war. Während der kompletten, klinischen Remission im November 2000 stieg der Anteil des monoklonalen Rearrangements auf den Höchstwert von 91,1%.

Auch bei Patient LO (s. Abb. 11) bestätigt sich ein reziproker Zusammenhang zwischen Frequenz der im Blut nachweisbaren, klonalen Rearrangements und Klinik nicht. Hier stieg zwischen 03/00 und 03/01 während klinischer Progredienz der Anteil

klonaler Rearrangements an, auch während einer darauffolgenden Remission und eines Rezidivs sanken bzw. stieg die Frequenz der im Blut nachweisbaren, klonalen Zellen.

Eine Erklärung für die zur Klinik reziproke Entwicklung der klonalen Rearrangements im Blut könnte ein Shift der Tumorzellen zwischen Haut und Blut sein. Eine Besserung der Hauterscheinungen bedeutete lediglich, dass die klonalen T-Zellen ins Blut verdrängt wurden und viceversa.

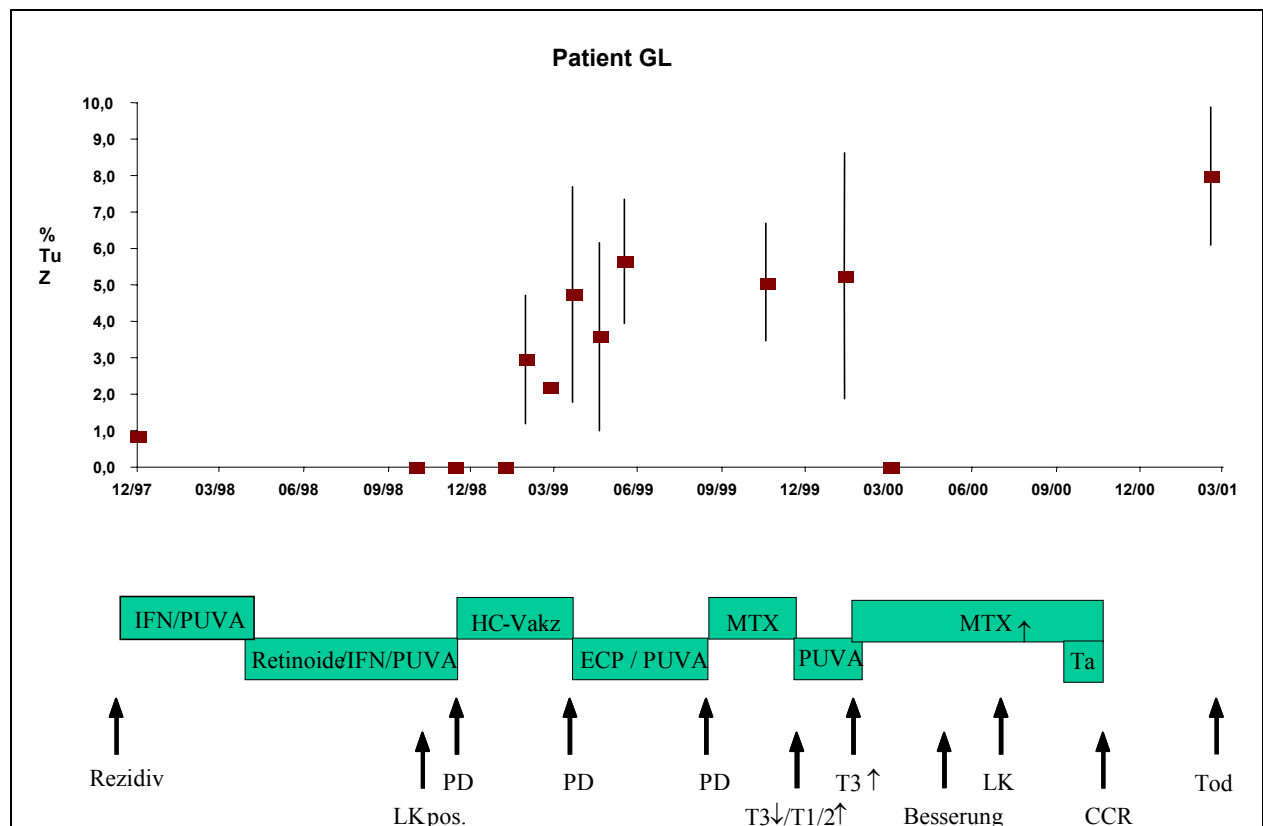


Abb. 10: Patient GL: Anteil klonaler Zellen im Blut im Verlauf, Werte 11/99 29,5%, 11/00 91,0%, 01/01 21,0% nicht eingezeichnet.(C)CR: (klinisch) komplette Remission, PR: partielle Remission, Rez.: Rezidiv, PD: Progressive Disease, St. Steroid, MTX Methotrexat, Ta Targretin, ECP Extrakorporale Photophorese.

Es wäre möglich, dass topische Therapieformen die klonalen Zellen nicht eradizieren, sondern es den klonalen Zellen ermöglichen, abzuwandern. Der Anstieg von 0 auf 9% 11/98 bei FI zum Zeitpunkt einer unter Steroiden erreichten Remission und eine leichte Zunahme der klonalen Rearrangements während der PUVA-Therapie bei Patient LO 03/99 untermauern diese Annahme.

Als Konsequenz daraus ergäbe sich die Notwendigkeit einer systemischen Therapie. Ein Indiz für die Wirksamkeit einer systemischen Therapie wäre die Verringerung der klonalen T-Zellen auch im Blut. Ein Beispiel dafür war die prozentuale Abnahme der klonalen Rearrangements von 29,5% 11/99 auf 5,2% 01/00 bei Patient GL unter Methotrexat-Therapie trotz Verschlechterung der Klinik. Ein nur geteiltes Ansprechen war auch während der Hybridzellvakzinierung bei Patient LO zu beobachten, die klinisch zwar keine Besserung brachte, während derer im Blut jedoch der Anteil klonaler Rearrangements unter das Detektionslimit sank.

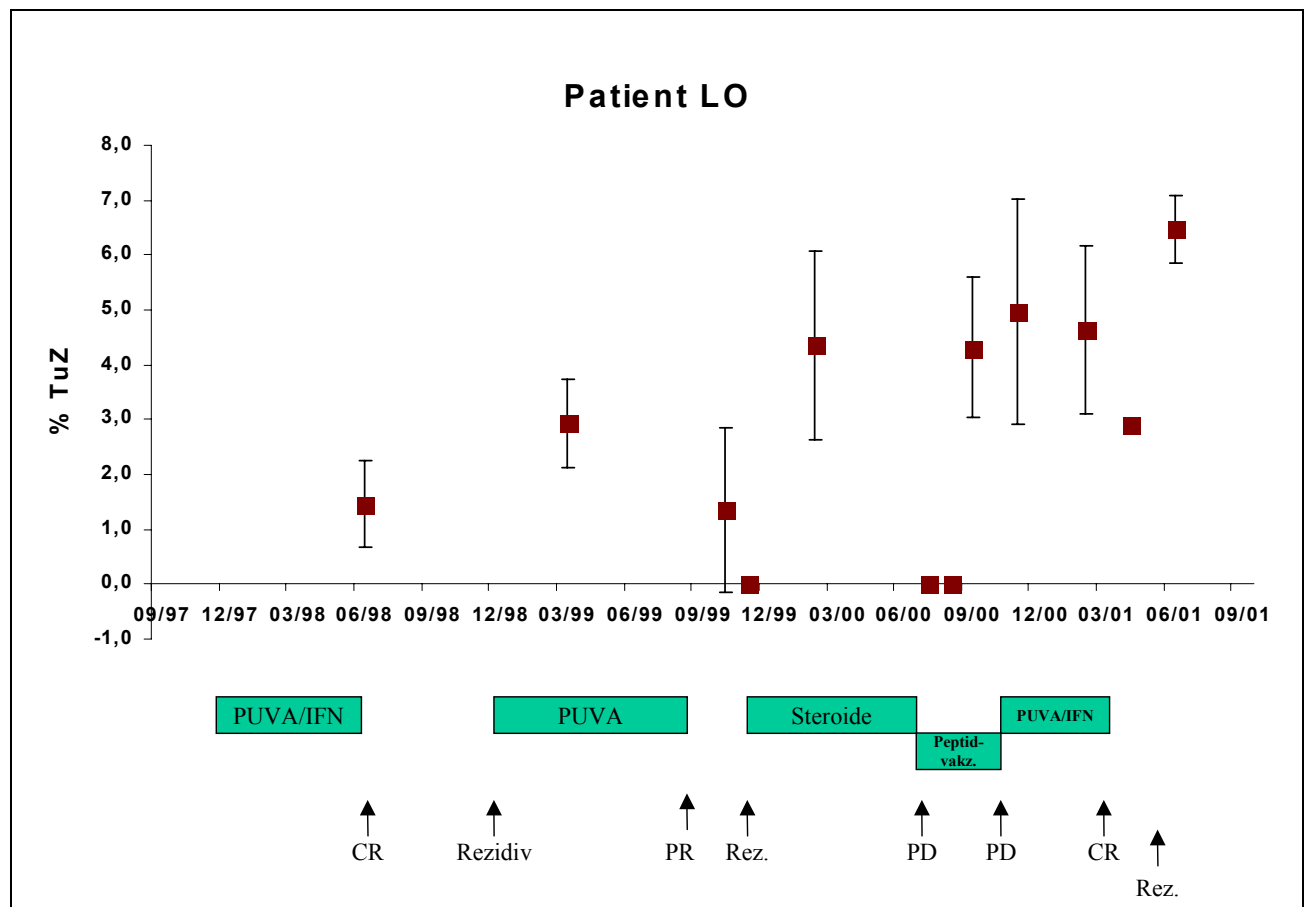


Abb. 11: Patient LO: Anteil zirkulierender, klonaler Zellen im Verlauf. Erläuterungen s. Abbildung 10

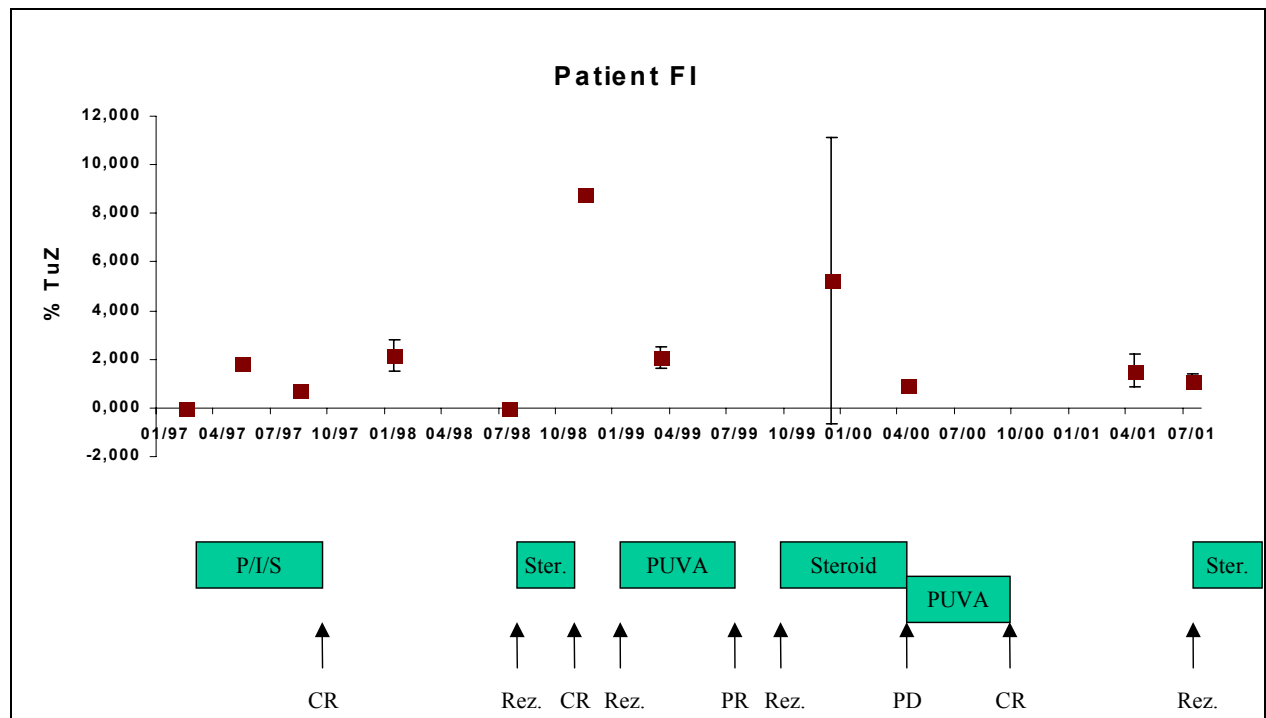


Abb. 12: Patient FI: Anteil der zirkulierenden Tumorzellen im zeitlichen Verlauf in Bezug auf Klinik und Therapie. P/I/S : PUVA/IFN/Steroid, Ster. : Steroid, sonstige Erläuterungen siehe Abbildung 10

Es sind jedoch auch Situationen zu beobachten, in denen eine systemische Therapie keine Abnahme klonaler Rearrangements im Blut mit sich brachte, z.B. während der Hybridzellvakzinierung 02/99 und der MTX-Therapie 11/99 bei dem Patienten GL. Das bedeutet, dass die Klinik und die Zahl der klonalen Zellen im Blut nicht miteinander korrelieren. Mutmassungen über Tendenzen in der Variation der im Blut zirkulierenden, klonalen Zellen bleiben aufgrund der geringen Patientenzahl und des hohen Variationskoeffizienten Spekulation.

Vergleichbare quantitative Untersuchungen klonaler Rearrangements im Blut bei MF-Patienten gibt es bisher in der Literatur nicht. Zur Erforschung des Krankheitsverlaufs der MF und der Therapiewirksamkeit mittels molekularbiologischer Daten wäre die Untersuchung einer grossen Patientenzahl in einer prospektiven Multicenterstudie notwendig, was aus den oben genannten Gründen schwierig ist.

4.2.4 Diskussion der Ergebnisse bei SPP-Patienten

Die Einordnung der SPP ist umstritten. Von einigen Autoren wird sie als abortives Lymphom oder benigne Erkrankung, von anderen als Vorstufe eines CTCL bewertet. Der Nachweis eines klonalen Rearrangements in der Haut könnte auf eine CTCL-Erkrankung hindeuten. Mittels PCR mit TCR γ -Konsensusprimern und Auftrennung mittels TGGE fanden wir bei 9 von 14 SPP-Patienten ein monoklonales Rearrangement im Blut. Da die durchschnittliche N-Sequenz mit 10,2 Basenpaaren länger war als bei den MF-Patienten, konnte mit Hilfe der klonspezifischen PCR bei 6 SPP-Patienten (66%) das klonale Rearrangement in allen übrigen Blutproben nachgewiesen werden. Die Länge der N-Sequenz war in anderen Untersuchungen (47,60) zur Monoklonalität bei SPP Patienten nicht angegeben.

4.2.4.1 Blutklonalität bei Nicht-Lymphom-Patienten

Der Nachweis eines klonalen T-Zell-Rearrangements im Blut deutet auf eine Lymphom-Erkrankung hin. Bei ca. 40 % der Patienten mit früher und 73% mit fortgeschrittener MF-Erkrankung (31), jedoch nicht bei gesunden Probanden konnten einige Autoren (41,79) im Blut ein monoklonales Amplifikat mittels PCR nachweisen. Andere fanden jedoch auch bei Nicht-Lymphom-Patienten klonale T-Zellen im Blut. Delfau-Larue et al. (29) konnten bei 30% der Patienten einen Blutklon allein nachweisen, egal ob die Patienten an einer MF erkrankt waren oder nicht. Niedrigere Zahlen ermittelten Muche et al. (74) und Beylot-Barry et al. (12). Ein häufigerer Nachweis von Blutklonalität wurde bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, anderen Hautkrebsarten (74), benignen Dermatosen (31) und mit erworbenen oder angeborenen CD4-Lymphozytopenien (11,101) gesehen, Krankheitsbilder, die bei den von uns untersuchten Patienten ausgeschlossen wurden.

Schon seit längerem ist die Expansion von monoklonalen V β -Rearrangements unter CD8⁺-Zellen, im späteren Lebensalter auch unter CD4⁺-Zellen bekannt (84,100,108). Bei gesunden, meist über 60 Jahre alten Probanden konnte von Schwab et al. (100) in 8/11 Fällen in der CD4-positiven und in 7 von 11 Probanden in der CD8-positiven Fraktion ein Blutklon gefunden werden. Die Probanden entwickelten auch im weiteren Verlauf kein Lymphom. Eine mögliche Erklärung ist die Bildung und Persistenz von Klonen reaktiver Zellen nach Infektionskrankheiten. Die von uns untersuchten Patienten zeigten bei Diagnosestellung einen Altersdurchschnitt von 68,1 Jahren mit 7 Patienten über 65 Jahren. Mittels Zellsortierung der PBMC von

zwei zufällig ausgewählten Patienten wurde der nachgewiesene Klon dem CD4-positiven Zellspektrum zugeordnet.

4.2.4.2 Zusammenhang zwischen Blutklonalität und SPP-Erkrankung

In den Hautproben war der Nachweis der im Blut gefundenen klonalen Rearrangements mit Hilfe der klonspezifischen Primer nicht möglich, und zwar trotz nochmaligen Einsatzes von PCR-Produkt in einer geschachtelten PCR zur Erhöhung der Sensitivität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Klemke et al. (60), die zwar mittels Genescan-Analyse bei 2/6 SPP-Patienten im Blut und 2/5 Patienten in der Haut, jedoch nur bei 1/8 Patienten in beiden Kompartimenten ein monoklonales Rearrangement zeigen konnten. Haeffner et al. (47) dagegen gelangen bei 2/3 Patienten der Klonalitätsnachweis in der Haut bei gleichzeitiger Dominanz von CD4-positiven Zellen, Blutproben wurden von ihm nicht untersucht.

Stünden die im Blut gefundenen, klonalen Zellen im Zusammenhang mit der SPP-Erkrankung, gäbe es dafür folgende Erklärungsmöglichkeiten:

Bei den klonalen Zellen handelt es sich um Tumorzellen, die, wie ihre Vorläuferzellen, aufgrund ihrer *skin homing*-Natur von der Haut über die Lymphknoten ins Blut zirkulieren. Die Zellen wären dann zwar auch in der Haut vorhanden, jedoch aufgrund einer zu geringen Sensitivität der Methode nicht nachweisbar. Die Konzentration der Tumorzellen in der Haut müsste damit aufgrund eines hohen Anteils polyklonaler, reaktiver Zellen niedriger als eine klonale in 10^5 polyklonalen Zellen sein. Gerade in Frühstadien von CTCL ist eine stark ausgeprägte Immunantwort durch CD8⁺-Zellen belegt (8), jedoch ist es unwahrscheinlich, dass so wenige Zellen eine Hautläsion hervorrufen.

Bei den klonalen Zellen im Blut könnte es sich ausserdem um reaktive Zellen handeln, die sich als Immunantwort auf die SPP gebildet haben. Dafür spräche die Expression von CD8, der von den für die Immunantwort wichtigen zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. Durch Zellsortierung mittels Midi-Macs und anschliessendem Einsatz der DNA zweier Patienten in der klonspezifischen PCR wurde die Zugehörigkeit der klonalen Zellen zu den CD4-Zellen gezeigt, ein Ergebnis, das die genannte Erklärung zumindest bei diesen Patienten unwahrscheinlich erscheinen lässt. Ausserdem müssten die reaktiven Zellen dann auch in der Haut in einer ähnlichen Konzentration wie im Blut vorliegen, ein weiteres Argument, das gegen die Entwicklung der klonalen Zellen als Reaktion auf die SPP-Erkrankung spricht.

Als letztes bleibt die Möglichkeit, dass der Nachweis klonaler Rearrangements im Blut nicht direkt mit einer SPP-Erkrankung in Zusammenhang steht.

Wie oben beschrieben, konnten klonale Rearrangements im Blut bei gesunden Probanden sowohl von CD8- als auch CD4-positiven Zellen nachgewiesen werden (84,108). Schwab et al. (100) gelangen dieser Nachweis bei 8/11 meist über 60 Jahre alten Gesunden im CD4-positiven Spektrum. Zwar konnten auch wir bei 9 von 14 SPP-Patienten im Blut ein monoklonales Rearrangement nachweisen. Der Altersdurchschnitt unserer Patienten war zur Zeit der Probenentnahme bei 68,1 Jahren, 7 waren älter als 60, und durch Zellsortierung von 2 zufällig ausgewählten Patienten konnten die klonalen Rearrangements dem CD4-positiven Spektrum zugeordnet werden. Im Unterschied zu den von uns durchgeführten Untersuchungen benutzten Schwab et al. (100) jedoch die TCR- β -PCR, eine aufgrund geringer Sequenzhomologie zwischen den TCR- β -Ketten weniger spezifische Methode. Obwohl die Vergleichbarkeit unserer mit den Ergebnissen Schwabs et al. (100) fraglich ist, wäre es denkbar, dass der Nachweis klonaler Rearrangements nichts mit der Erkrankung an SPP zu tun hat. Bei den von uns untersuchten MF-Patienten wurde ein Rearrangement von V γ II- IV nur in 12%, bei den SPP-Patienten dagegen in 55% der Fälle gefunden. Breit et al. (17) beschreiben eine Prädominanz von V γ I bei Thymozyten und akuter T-Zell-Leukämie, jedoch ein Rearrangement von V γ II bei der Mehrheit gesunder Probanden. Dies legt die häufigere Verwendung der V γ II-IV-Rearrangements bei reaktiven Zellen nahe und spricht für den reaktiven Charakter des im Blut nachgewiesenen Klons.

Der Anteil der von uns gesehenen SPP-Patienten mit klonalem Rearrangement im Blut ist nur unwesentlich höher als der von gesunden Probanden gleichen Alters. Da CTCL schon in den Frühstadien eine systemische Erkrankung darstellen, hätte der Nachweis im Blut detektierter, klonaler T-Zellen auch in den Hautläsionen von SPP-Patienten einen direkten Hinweis auf die Einordnung der SPP als CTCL gegeben. Unsere Ergebnisse sprechen jedoch dagegen: Es gab keinen Hinweis für die Einordnung der Small Plaque Parapsoriasis als kutanes T-Zell-Lymphom

5 Zusammenfassung

Mittels klonspezifischer PCR ist ein spezifischer Nachweis kleiner DNA-Mengen möglich. Wir haben von 47 MF-Patienten Hautproben mittels TCR- γ - und $-\beta$ -spezifischer Konsensusprimer untersucht. 50 TCR- γ - und 7 TCR- β -Sequenzen wurden sequenziert, von 15 bzw. 5 Patienten war die Entwicklung eines N-spezifischen Primers möglich. Damit konnten in 39/52 Blutproben im Gegensatz zu 6/52 mit den für TCR- γ spezifischen Konsensusprimern zirkulierende, klonale Zellen gezeigt werden. Dies bestätigt die höhere Sensitivität der klonspezifischen PCR gegenüber der Konsensusprimer-PCR. Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen Frequenz der zirkulierenden klonalen Zellen und klinischem Verlauf gibt, wurden für 4 Patienten mittels LightCycler die im Blut zirkulierenden klonalen Rearrangements quantifiziert. Ein Vergleich dieser Daten mit dem klinischen Verlauf ergab bei zwei Patienten eine Tendenz zu einem reziproken Verhältnis zwischen beiden Parametern. Nur bei einem Patienten im Tumorstadium konnte eine Zunahme der Frequenz zirkulierender klonaler Rearrangements mit Verschlechterung des Krankheitsbildes eruiert werden.

Schwächen der Methode waren die Kürze der N-Sequenz der TCR- γ -Kette, weshalb nur für 15 von 50 TCR- γ -Sequenzen ein spezifischer Primer entworfen werden konnte. Eine Alternative war die aufwendigere Entwicklung von TCR- β -spezifischen Primern. Ausserdem beschränken die niedrige Patientenzahl und grosse Standardabweichungen während der quantitativen PCR mittels SYBR-Green im LightCycler die Aussagekraft der Daten.

Der Nachweis klonaler Rearrangements in Haut- und Blutproben von SPP-Patienten wäre ein Hinweis auf den Lymphomcharakter dieser Erkrankung. Bei 9 von 14 SPP-Patienten wurde in Blutproben mit Hilfe der für V γ 1-J γ 1/2 spezifischen Konsensusprimer ein monoklonales Rearrangement gefunden. Für 6 Patienten konnte ein klonspezifischer Primer entwickelt werden. Ein Nachweis der klonalen Sequenz aus dem Blut in der Haut war trotz einer geschachtelten PCR nicht möglich. Ein Grund dafür könnte sein, dass es sich dabei um monoklonale Rearrangements handelt, die bei bis zu 73% von Probanden mit einem Alter über 60 Jahren gefunden werden. Dass es sich bei den im Blut vorhandenen Rearrangements um reaktiv wachsende Klone handelt, die aufgrund einer in der Haut niedrigen Konzentration nicht nachweisbar waren, erscheint wegen ihrer CD4-Positivität wenig

wahrscheinlich. Einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen CTCL und SPP konnte also nicht gefunden werden.

LITERATURVERZEICHNIS

3. Ackerman AB, Schiff TA (1996): If small plaque (digitate) parapsoriasis is a cutaneous T-cell lymphoma, even an 'abortive' one, it must be mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 132: 562
4. Alibert JLM (1806): Tableau du plan fonoide: Description des maladies de la peau observée a l'hospital St. Louis, et exposition des meilleures méthodes suivies pour leur traitement. Paris, barios l'Ainé et files
5. Asadullah K et al. (1996): IL-7mRNA is not overexpressed in cutaneous t-cell lymphoma and is unlikely to be an autocrine growth factor in vivo. *Arch Derm Res* 289: 9-13
6. Asadullah K et al. (1996): Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of IL-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 107: 833-37
7. Asadullah K et al. (1997): Granzyme a mRNA expression in mycosis fungoides progression. *Blood* 90: 3810-11
8. Asadullah K et al. (1997): 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* 108: 743-7
9. Bakels V et al. (1992): Frequency and prognostic significance of clonal T-cell receptor rearrangements in the peripheral blood of patients with MF. *Archives in Dermatology* 128: 1602-1607
10. Bergman R et al. (1998): Immunophenotyping and t cell receptor gamma Rearrangement analysis as an adjunct to the histopathologic diagnosis of mycosis fungoides. *Journal of American Academy of Dermatology* 39: 554-559
11. Berliner N et al. (1986): T cell receptor gene rearrangements define a monoclonal T cell proliferation in patients with T cell lymphocytosis and cytopenia. *Blood* 67: 914-8.
12. Beylot-Barry M et al. (2001): Evidence that an identical t cell clone in skin and peripheral blood lymphocytes is an independent prognostic factor in primary cutaneous t cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 117: 920-926
13. Borst J et al. (1987): A t cell receptor γ /CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 324: 268-70
14. Bottaro M (1994): Heteroduplex analysis of t cell receptor γ gene Rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous lymphomas. *Blood* 83: 3271-78
15. Braun-Falco O. (1995): *Dermatologie und Venerologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York:1404-7
16. Breit TM et al. (1991): Limited combinatorial repertoire of $\gamma\delta$ t cell receptors expressed by t-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 5: 116-24
17. Breit TM et al. (1992): Receptor diversity of human T-cell receptor $\gamma\delta$ expressing cells. *Progress in Histo- and Cytochemistry* 26: 182 –193
18. Breit TM et al. (1994): Unravelling human t cell receptor junctional region sequences. *Thymus* 22: 177-199
19. Breit TM et al. (1995): Gene rearrangements in human T cells. *Leukemia* 9(5): 936
20. Breslauer KJ et al. (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 83: 3746-3750
21. Brocq L (1902): Les parapsoriasis. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* 3: 433
22. Burg G, Dummer R (1995): Small plaque (digitate) parapsoriasis is an 'abortive cutaneous T-cell lymphoma' and is not mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 131: 336-8
23. Campbell JJ et al. (1999): The chemokine receptor CCR4 in vacular recognition by cutaneous but not intestinal memory t cells. *Nature* 400: 776-80
24. Chiarion-Sileni V et al. (2002) : Phase II trial of interferon α 2a plus psoralen with ultraviolet light a in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer* 95: 569-75
25. Clemmensen OJ et al. (1983): Lymphocyte function and chromosome aberrations in patients with early mycosis fungoides and parapsoriasis en plaques. *J Invest Dermatol* 81: 308-13
26. Dalloul A et al. (1992): Interleukin-7 is a growth factor for Sézary lymphoma cells. *J Clin Invest* 90: 1054-60
27. Davis M, Bjorkman P (1988): T-cell antigen receptor genes and t-cell recognition. *Nature* 334: 395 – 402
28. Delfau-Larue MH et al. (1998): Prognostic significance of a polymerase chain reaction-detectable dominant T-lymphocyte clone in cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Blood* 92(9): 3376-80.
29. Delfau-Larue MH et al. (2000): Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 96(9): 2987-2992

30. Dippel E et al. (1999): Clonal t cell receptor γ chain gene Rearrangement in advanced cutaneous t cell lymphoma: A critical evaluation. *J Pathol* 188: 146–154
31. Dippel E et al. (2001): T-cell clonality of undetermined significance. *Blood* 98(1): 247-48
32. Dobbeling U et al. (1998): Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous t cell lymphoma cells. *Blood* 92: 252-258
33. Dongen JJM, van et al. (1990): Development of human T-lymphocytes and their thymus dependency. *Thymus* 16: 207 – 234
34. Dongen JJM, van et al. (1998): Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 352: 1731-38
35. Dongen JJM, van et al. (2003): Design and standardization of pcr primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and t cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257-2317
36. Dummer R et al. (1992): Soluble interleukin-2 receptors inhibit interleukin 2-dependent proliferation and cytotoxicity: Explanation for diminished natural killer cell activity in cutaneous T-cell lymphomas in vivo? *Journal of Investigative Dermatology* 98: 50-4
37. Eckert C et al. (2000) : Potential of LightCycler technology for quantification of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14: 316-23
38. Edelson R et al. (1987): Treatment of cutaneous t cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N Engl J Med* 316: 297-303
39. Fischer TC et al. (2004). Genomic aberrations and survival in cutaneous t cell lymphoma: *J Invest Dermatol* 122: 579-86
40. Fleischmayer R et al. (1965): Parapsoriasis en plaques and mycosis fungoides. *Dermatologica* 131: 149-160
41. Frazer-Andrews EA et al. (2000): Detection of a peripheral t cell clone is an independent prognostic factor in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 114: 117-121
42. Garatti SA et al. (1995): Bcl-1, bcl-2, p53, c-myc, and *lyt-10* analysis in cutaneous lymphomas. *Recent Results Cancer Research* 139: 249-261
43. Gill JI et al. (1994): Immunoglobulin and t-cell receptor gene rearrangement. *Hematol Oncol Clin North Am.* 8(4): 751-70.
44. Greene TC et al. (1979): Mycosis fungoides: Epidemiologic observations. *Cancer Treat Rep* 63: 597 – 606
45. Greiner MH et al.: (1999): Advances in molecular hematopathology: T-cell receptor γ and bcl 2 genes. *Am. J. Path.*; 154: 7 – 9
46. Gutzmer R et al. (2001): Detection of clonal t cell receptor γ gene Rearrangements in cutaneous t cell lymphomas by LightCycler polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 116: 926-932
47. Haeffner AC et al. (1995): Differentiation and clonality of lesional lymphocytes in small plaque parapsoriasis. *Arch Dermatol* 131: 321-4
48. Hansen ER et al. (1996): Immunoregulatory events in the skin of patients with cutaneous t cell lymphoma. *Arch. Dermatol* 132: 554-61
49. Harmon CB et al. (1996): Detection of circulating t cells with CD4+/CD7- immunophenotype in benign and malignant lymphoproliferative dermatoses. *Journal of American Academy of Dermatology* 35: 404-410
50. Herrmann JJ et al. (1995): Treatment in mycosis fungoides with photochemotherapy (PUVA): Longterm follow-up. *J Am Acad Dermatol* 33: 234-42
51. Hoppe RT et al. (1979): Electron-beam therapy for mycosis fungoides: The stanford experience. *Cancer Treat Rep* 69: 691- 700
52. Hu CH (1993): Parapsoriasis. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF: *Dermatology in General Medicine* (IE), in 2 vols. 4th ed. New York, NY, Mc Graw-Hill: 1124-28
53. Izbán KF et al. (1998): Immunohistochemical Analysis of mycosis fungoides in paraffin-embedded tissue sections. *Mod Pathol* 11(10): 978-82
54. Jakob T et al. (1996) : Stage dependent expression of CD7, CD45R0, CD45RA and CD25 on CD4 positive peripheral blood t cell lymphocytes in cutaneous t cell lymphoma. *Acta Dermatol Venero* 76: 34-36
55. Kaltoft K et al (1994): Cytogenetic findings in in cell lines from cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clinics* 12: 295 – 304
56. Kanavaros P et al. (1994): Mycosis fungoides: expression of C-myc, p62, p63, bcl-2 and PCNA proteins and absence of association with Epstein-Barr virus. *Pathologic Research Practice* 190: 767-774
57. Karenko L et al. (1999): Notable losses at specific regions of chromosomes 10q and 13q in the Sézary Syndrome detected by comparative genomic hybridization. *J Invest Dermatol* 112. 392-5

58. Karenko L et al. (2003): Chromosomal abnormalities in relation to clinical disease in patients with cutaneous t-cell lymphoma: a 5-year follow up study. *Br J Dermatol.* 148(1): 55-64
59. Kikuchi A et al. (1997): Absence of human t-lymphotropic virus type I in Japanese patients with cutaneous t-cell lymphoma. *Blood* 89: 1529-32
60. Klemke CD et al. (2002): Clonal t cell receptor γ -chain gene Rearrangement by PCR-based Gene-Scan analysis in the skin and blood of patients with parapsoriasis and early-stage mycosis fungoides. *Journal of Pathology* 197: 348-54
61. Kneba M et al. (1995): Analysis of rearranged t cell receptor β -chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR Fragment Analysis. *Blood* 96: 3930-37
62. Laetsch B et al. (2000): CD4 + /CD7- T Cell frequency and polymerase chain reaction-based clonality assay correlate with stage in cutaneous t cell lymphomas. *Journal of Investigative Dermatology* 114: 107-111.
63. Lambert WC, Everett MA (1981): The nosology of parapsoriasis. *J Am Acad Dermatol* 5: 373
64. Lazar AP et al. (1989): Parapsoriasis and mycosis fungoides: the Northwestern University experience, 1970 to 1985. *J Am Acad Dermatol* 21: 919
65. Lefranc MP et al. (2003): IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 31: 307-10
66. Lefranc MP et al. (2003): IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and t cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia* 17: 260-66
67. Lessin SR et al. (1991): Molecular diagnosis of cutaneous t cell lymphoma: Polymerase chain reaction amplification of t cell antigen receptor β -chain Rearrangements. *Journal of Investigative Dermatology* 96: 299-302
68. Lindae ML et al. (1988): Poikilodermatous mycosis fungoides and atrophic large-plaque parapsoriasis exhibit similar abnormalities of T-cell antigen expression. *Arch Dermatol* 124: 366
69. Lukowsky A et al. (1998): Detection of monoclonal t cells with TCR- γ -PCR in mycosis fungoides. *Hautarzt* 49(8): 641-45
70. Lukowsky A et al. (2000): Detection of expanded t cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by t cell receptor gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 115: 254- 259
71. Lukowsky A et al. (2002): A t-cell receptor gamma polymerase chain reaction assay using capillary electrophoresis for the diagnosis of cutaneous t-cell lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 11(2): 59-66
72. Mielke V et al. (1994): Clonal disease in early cutaneous t-cell lymphoma. *Dermatologic Clinics* 12: 351 – 360
73. Morales MM et al. (2003): Viral infection, atopy and mycosis fungoides: a European multicentre case-control study. *Eur J Cancer* 39(4): 511-6
74. Muche JM et al. (2003): Peripheral blood t cell clonality in mycosis fungoides and nonlymphoma controls. *Diagn Mol Pathol* 12: 142 – 150
75. Muche JM (2000): Peripheral blood t cell clonality in mycosis fungoides- an independent prognostic marker? *J Invest Dermatol* 115(3): 504-5
76. Muche JM (2000): Treatment of cutaneous t cell lymphomas. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 19(2): 142-148
77. Muche JM, Sterry W. (2002): Vaccination therapy for cutaneous t-cell lymphoma. *Clin Exp Dermatol* 27(7): 602- 607
78. Muche JM et al. (2004): Cellular coincidence of clonal t cell receptor rearrangements and complex clonal chromosomal aberrations – a hallmark of malignancy in cutaneous t cell lymphoma: *J Invest Dermatol* 122: 574 – 78
79. Muche JM.: PCR- und Elektrophoresetechniken zum Nachweis einer monoklonalen T-Zell-Vermehrung am Beispiel der Diagnostik der Mycosis fungoides, Dissertation: 48 ff
80. Muche JM et al. (1997): Demonstration of frequent occurrence of clonal t cells in peripheral cutaneous t cell lymphoma. *Blood* 90: 1636
81. Nakao M et al. (2000): Rapid and reliable quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using rearranged immunoglobulin and t cell receptor loci by LightCycler technology. *Cancer Research* 60: 3281-89
82. NCBI-Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
83. Peccoud J et al. (1998): Statistical estimations of PCR amplification rates, in Ferré F.: *Gene Quantification*, Birkhäuser Verlag, Boston: 111-128
84. Posnett DN et al. (1994): Clonal population of t cells in normal elderly humans: The t cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 179: 609-18
85. Powell EE et al. (1992): Measurement of mRNA by quantitative PCR with nonradioactive label. *J Lipid Res* 33: 609-14

86. Qiagen Inc. (1994): Handbook for the DIAGEN TGGE-system. Qiagen Inc., 9259 Etan Avenue, Chatsworth CA 91311, USA: 29
87. Rasmussen R (2001) : Quantification on the LightCycler. in Meuer S. et al.:Rapid cycle real-time PCR, Springer, Heidelberg: 21-35
88. Regauer S et al. (2002): Monoclonal t cell receptor gamma rearrangement in vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 160: 1035 – 1045
89. Reischl U, Kochanowski B (1995): Quantitative PCR. *Molecular Biotechnology* 3: 55-71
90. Rich BE et al. (1993): Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas on interleukin 7 transgenic mice. *J Exp Med* 177: 305-16
91. Roche Molecular Biochemicals (2000): LightCycler-System. Real-time PCR- as flexible as you are: 12-14
92. Rook AH et al. (1995): The immunopathogenesis of cutaneous t-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9: 997-1010
93. Rowden G et al. (1979): Target role of langerhans cells in mycosis fungoides: Transmission and immuno-electron microscopic studies. *J Cutan Pathol* 6(5): 364-82
94. Rowen L et al. (1996): The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β t-cell receptor locus. *Science* 272: 1755-62
95. Rychlik W (1994): Oligo Primer Analysis Software Version 5.0 for Windows, Manual. National Biosciences, Inc. (NBI)
96. Samman PD (1972): The natural history of parapsoriasis en plaques (chronic superficial dermatitis) and prereticulotic poikiloderma. *Br J Dermatol* 87: 405-11
97. Samman PD (1976): Parkes Weber Lecture 1976: Mycosis fungoides and other reticulosies. *Clin Exp Dermatol* 1: 197 – 214
98. Scheller U et al. (1998): Detection of clonal t-cell receptor gamma gene rearrangements in cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and frag-ment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis* 19: 653–658
99. Schneider BF et al. (1995): Familial occurrence of cutaneous t-cell lymphoma: A case report of monozygotic twin sisters. *Leukemia* 9: 1979-81
100. Schwab R et al. (1997): Expanded CD4+ and CD8+ t-cell clones in elderly humans. *The Journal of Immunology* 158: 4493-99
101. Soydens H et al. (2000): Transient t cell receptor beta-chain variable region-specific expansions of CD4+ and CD8+ t cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J Infect Dis* 181:107-20.
102. Sterry W et al. (1989): CD4+ cutaneous t-cell lymphomas show the phenotype of helper/inducer t-cells (CD45RA-, Cdw29+). *Journal of Investigative Dermatology* 93: 413-416
103. Tycko B et al. (1989): Polymerase chain reaction amplification of rearranged antigen receptor genes using junction-specific oligonucleotides: Possible application for detection of minimal residual disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cells* 7: 47 – 52
104. Vega F et al. (2002): Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and it's relationship to clinical course. *Blood* 100(9): 3369-73
105. Velden VHJ van der et al. (2002): T cell receptor gamma gene Rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative pcr analysis. *Leukemia* 16: 1372-80
106. Volkenandt M et al. (1991): Development of highly specific and sensitive molecular probes for detection of cutaneous lymphoma. *J Invest Dermatol* 97: 137 – 140
107. Volkenandt M et al. (1993): Molecular detection of clone-specific DNA in hypopigmented lesions of a patient with early evolving Mycosis fungoides. *Br Jour Dermatology* 128: 423 – 428
108. Wack A et al. (1998): Age-related modifications of the human alphabeta t cell repertoire due to different clonal expansion in the CD4+ and CD8+ subsets. *Int Immunol* 10: 1281-8
109. Wang Z et al. (1998): Determination of target copy number of quantitative standard used in PCR based diagnostic assays. In Ferré F.: *Gene Quantification*, Birkhäuser Verlag, Boston: 31-44
110. Weinstock MA et al. (1988): Mycosis fungoides in the United States. *JAMA* 60: 42-46
111. Wetmur JG (1991): DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Critical Revue in Biochemistry and Molecular Biology* 26: 227-259
112. Willemze R et al. (1997): 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* 90(1): 354-71
113. Zackheim HS et al. (1990): Topical carmustine for cutaneous t cell lymphoma: A 15-year experience in 143 patients. *J Am Acad Dermatol* 22: 802

114. Zackheim HS et al. (1998): Treatment of cutaneous T cell lymphoma with retinoids. *Dermatologic Therapy* 7: 15 - 20
115. Zucker-Franklin D et al. (1994): The role of human t-cell lymphotropic viruses (HTLV I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Derm* 13: 160-65

Erklärung an Eides Statt

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

Berlin, im Juli 2005

Jürgen Heim

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei den MTA Frau Audring, Frau Richter und Frau Dijkstal für die freundliche Hilfe.

Herzlich danken möchte ich auch Privatdozent Dr. Lukowsky für die wissenschaftliche Unterstützung. Besonders bei Privatdozent Dr. Muche bedanke ich mich für die gute Betreuung.

Von PD Dr. Lukowsky und PD Dr. Muche wurden mir die Sequenzierdaten zur Verfügung gestellt, vielen Dank.

Einen herzlichen Dank noch an meine Familie.

Danke an Sabina Rolle für das tolle Layout der Arbeit und besonders an Carlos Martinez Valle für sein liebevolles Dasein.