

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig

**Untersuchung zur Korrelation von Immunphänotyp und Klonalität bei
Mycosis fungoides mittels Lasermikrodissektion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eva Thaller

aus Vilsbiburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. med. C. A. Sander

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Zimmermann
Priv. -Doz. Dr. med. St. Ihrler

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Mycosis fungoides	6
1.1.1.	Epidemiologie	6
1.1.2.	Ätiologie	6
1.1.3.	Klinik und Verlauf	8
1.1.4.	Diagnose	9
1.1.5.	Staging und Therapie.....	11
1.2.	Die T- Zell Entwicklung	13
1.3.	Oberflächenmarker und ihre Veränderung während der T-Zell- Entwicklung.....	14
1.4.	T- Zell-Rezeptorkomplex und Rearrangement.....	16
1.5.	Genetische Grundlagen der T-Zell-Rezeptorvielfalt.....	18
1.6.	Klonalitätsuntersuchung.....	19
1.7.	Immunhistochemie	21
1.8.	Lasermikrodissektion	24
1.9.	Ziel der Untersuchung.....	25
2.	Material und Methoden	26
2.1.	Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial	26
2.2.	DNA- Extraktion aus Paraffingewebe	28
2.3.	PCR und Gelelektrophorese	31
2.4.	Immunhistochemische Färbung für Lasermikrodissektion.....	38
2.5.	Methode der Lasermikrodissektion	41
2.6.	DNA-Extraktion für Lasermikrodissektion	45
2.7.	β -Globin-Gen PCR und Agarosegelelektrophorese.....	45
2.8.	PCR für Lasermikrodissektion und Gelelektrophorese	48
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung (TCR γ -PCR) aus Paraffingewebe	51
3.2.	Ergebnisse der Lasermikrodissektion	54

4.	Diskussion.....	65
5.	Zusammenfassung	72
6.	Literaturverzeichnis	75
7.	Danksagung	79
8.	Lebenslauf.....	81

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
APPAP	Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
COP	Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison
CTCL	Cutane T-Zell Lymphome
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	Extrakorporale Photopherese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HTLV	Humanes T-Zell-Lymphotropes Virus
ICAM 1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LCM	Lasermikrodissektion
LS	Längenstandard
mA	Milliampere
MF	Mycosis fungoides
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PUVA	Psoralen und Ultraviolettes Licht
RNA	Ribonukleinsäure
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	Terminale Deoxynukleotidtransferase
Th 1, Th 2	T-Zell Untergruppen 1 und 2
TNM	Stadieneinteilung maligner Tumore (T=Tumor, N=Nodus=Lymphknoten, M=Metastasen)
U	Units

1. Einleitung

1.1. Mycosis fungoides

Die Mycosis fungoides (MF) wurde erstmals von dem französischen Dermatologen Alibert im Jahr 1806 beschrieben. Er benannte die Krankheit aufgrund der, einer Mykose ähnlichen Erscheinung zu Beginn der Erkrankung sowie den schwammartigen Knoten während des späteren Tumorstadiums (2). Die MF ist das häufigste primär kutane Lymphom. Es gehört zu den niedrigmalignen peripheren T-Zell-Lymphomen.

Die MF präsentiert sich typischerweise als indolenter Hautausschlag mit geröteten, schuppigen Flecken oder Plaques, die häufigen Hauterkrankungen wie chronischem Ekzem oder Psoriasis ähneln.

1.1.1. Epidemiologie

Die Inzidenz der MF wird mit 0,4 pro 100 000 (USA) angegeben.

Bei einer Geschlechtsverteilung von männlich zu weiblich im Verhältnis 2:1 beträgt das Manifestationsalter 55-60 Jahre.

1.1.2. Ätiologie

Die genaue Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind nach wie vor unklar. Umweltbedingte und berufliche Exposition gegenüber Chemikalien mit daraus folgender chronischer Antigenstimulation, wurden mit der Entstehung der MF in Verbindung gebracht (19). Dies konnte jedoch trotz umfassenden Studien nicht belegt werden (46).

Chromosomale Veränderungen treten bei den kutanen T-Zell-Lymphomen regelmäßig auf (38).

Die gehäufte Assoziation mit bestimmten Histokompatibilitätsantigenen deutet auf eine mögliche genetische Prädisposition hin. Zum Beispiel berichteten Safai et al.(35) über ein statistisch signifikant gehäuftes Vorkommen des Histokompatibilitätsantigens HLA-DR5 bei Patienten mit MF. Eine Beteiligung des humanen T-Zell-lymphotropen Virus (HTLV-I) wurde intensiv untersucht, wobei in unterschiedlicher Häufigkeit HTLV- Sequenzen gefunden wurden (20, 17). Möglicherweise spielt ein defektes oder variiertes HTLV-I ähnliches Virus eine pathogene Rolle. Andere Untersuchungen wiederum zeigten, dass es keinen Hinweis auf Integration von HTLV-I Provirus in die DNA bei lymphoproliferativen Erkrankungen wie der MF gibt (51).

Ausgehend von Hinweisen für das Vorliegen von zwei T-Helfer-Lymphozyten Untergruppen (Th-1 und Th-2) (33), mit unterschiedlichen Zytokinsekretionsmustern, wurde auch die Rolle der Zytokine intensiv untersucht.

Th-1-Helferzellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) und dienen dadurch der zellvermittelten Immunantwort, der T-Zell-Proliferation und der Makrophagen-Aktivierung.

Dagegen unterstützen die Th-2-Helferzellen durch die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-10 die B-Zell vermittelte Immunantwort (15).

In den frühen Phasen der MF findet sich in den Hautinfiltraten ein rein Th-1-artiges Zytokinprofil der Infiltratzellen (34). Die Sekretion von IFN- γ induziert die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf den läsionalen Keratinozyten. Dieses bedingt den Epidermotropismus der Lymphozyten (30). Der Verlust des Epidermotropismus im Tumorstadium der Erkrankung könnte durch das Überwiegen des Th-2-Klons erklärt werden. Die damit einhergehende vermehrte Produktion von IL-4 hemmt die Produktion von IFN- γ und damit die Expression von ICAM-1.

Asadullah et al (4) konnten, indem sie Hautbiopsien von MF-Patienten mit Biopsien von Psoriasis-Patienten oder gesunder Haut verglichen, eine Überexpression von IL-15 und IL-16 nachweisen. Außerdem ergaben sich

Hinweise auf eine stadienabhängige Zunahme dieser Zytokine während des Krankheitsverlaufes. IL-15, das von den Keratinozyten und den dendritischen Zellen der Haut exprimiert wird, stellt einen wichtigen Viabilitätsfaktor (viable = lebensdienlich) für die Zellen der lymphoproliferativen Erkrankungen dar (12).

Als Hauptproduzenten von IL-16 wurden von Blaschke et al die infiltrierenden Lymphozyten identifiziert (7). IL-16 ist ein löslicher Ligand des CD4 Moleküls mit sowohl chemotaktischer Eigenschaft als auch der Eigenschaft eines wirksamen Wachstumsfaktors für CD4-positive Zellen. Das bedeutet, dass IL-16 wahrscheinlich an der Rekrutierung und Stimulation der CD4 Lymphozyten in den Hautläsionen der MF beteiligt ist und dadurch den beteiligten entzündlichen Prozess aufrechterhält.

Ein Konzept für die Pathogenese kutaner Lymphome, entwickelt von Dummer et al (14), sieht in Zytokinen und Chemokinen Viabilitätsfaktoren, die von der Haut zur Verfügung gestellt werden. Diese führen zu einer Hochregulation von apoptoseinhibierenden Proteinen wie beispielsweise BCL-2, wodurch die Akkumulation von malignen Zellen in der Haut möglich wird.

Normale Zellen altern und sterben, indem ihre Telomere verkürzt werden. Telomere sind repetitive Basensequenzen am Ende eines jeden Chromosomes, deren Aufgabe es ist, Struktur und Funktion des Chromosomes zu erhalten. Immortale Zellen haben sich dieser Regulation entzogen, indem die Telomeraseaktivität wiederhergestellt wurde. In Lymphozyten von Patienten mit kutanen T-Zell Lymphomen wurden eine erhöhte Telomeraseaktivität und verkürzte Telomerlängen festgestellt (52).

1.1.3. Klinik und Verlauf

Die MF ist charakterisiert durch ein stadienhaftes Auftreten von Hautveränderungen wie Patches, Plaques, Knoten oder generalisierter Erythrodermie.

Einer definitiven Diagnose geht oft ein prämykoides (patch-) Stadium voraus, währenddessen multiple, erythematöse, zum Teil

poikilodermatische, flache, ekzematöse Makulae auftreten. Hautbiopsien führen häufig nicht zur Diagnose (22, 26). Diese Patches halten sich nicht an bestimmte Prädispositionsstellen und können mit Juckreiz verbunden sein. Die Läsionen können über die Jahre zunehmen oder verschwinden und werden häufig als Parapsoriasis en plaque oder atopische Dermatitis mißinterpretiert. Die makulösen Patches können zunehmend infiltriert werden und bilden dann die für das infiltrative Stadium typischen Plaques. Dies sind scharf begrenzte, oft bizarr konfigurierte, plattenartige Herde von bräunlich-roter Farbe.

Das mykoideside/tumoröse Stadium der MF kann nach unterschiedlich langer Krankheitsdauer auftreten. Hierbei entstehen Knoten/Tumore die ulzerieren und nekrotisch zerfallen können.

Die einzelnen Stadien der Erkrankung müssen nicht nacheinander auftreten, sondern können auch parallel bestehen.

Die Wahrscheinlichkeit eines Befalls von Lymphknoten und viszerale Organen (Lunge, Milz, Leber, Gastrointestinaltrakt) korreliert mit dem Umfang des Hautbefalls.

1.1.4. Diagnose

Die histologische Diagnose der Frühform der MF ist schwierig und oft unspezifisch, da die histologischen Kriterien, die für die Diagnosestellung einer MF erforderlich sind, unter den Pathologen variieren.

Smoller et al (41) erarbeiteten in einer Studie einige signifikante histologische Parameter, anhand derer die MF von nicht-MF-Biopsien abgegrenzt werden kann. Zu diesen gehören unter anderem Pautriersche Mikroabszesse, halonierte Lymphozyten, Exozytose und disproportionierte Epi-dermotropismus.

Charakteristisch für die MF ist ein dichtes, bandförmiges Infiltrat in der oberen Dermis, bestehend aus atypischen lymphoiden Zellen. Diese weisen einen hyperchromatischen, zerebriformen Kern auf (Lutzner-Zellen). Sind mehrere derartige Zellen in der Epidermis zusammengelagert, spricht man von

Pautrierschen Mikroabszessen. Dieser Epidermotropismus ist typisch für die MF.

Im Tumorstadium finden sich massive lymphoide Infiltrate in der gesamten Dermis. Diese Zellen zeigen zahlreiche Mitosen und Zellkernpolymorphismen. Sie sind entdifferenziert und haben den Epidermotropismus verloren (39).

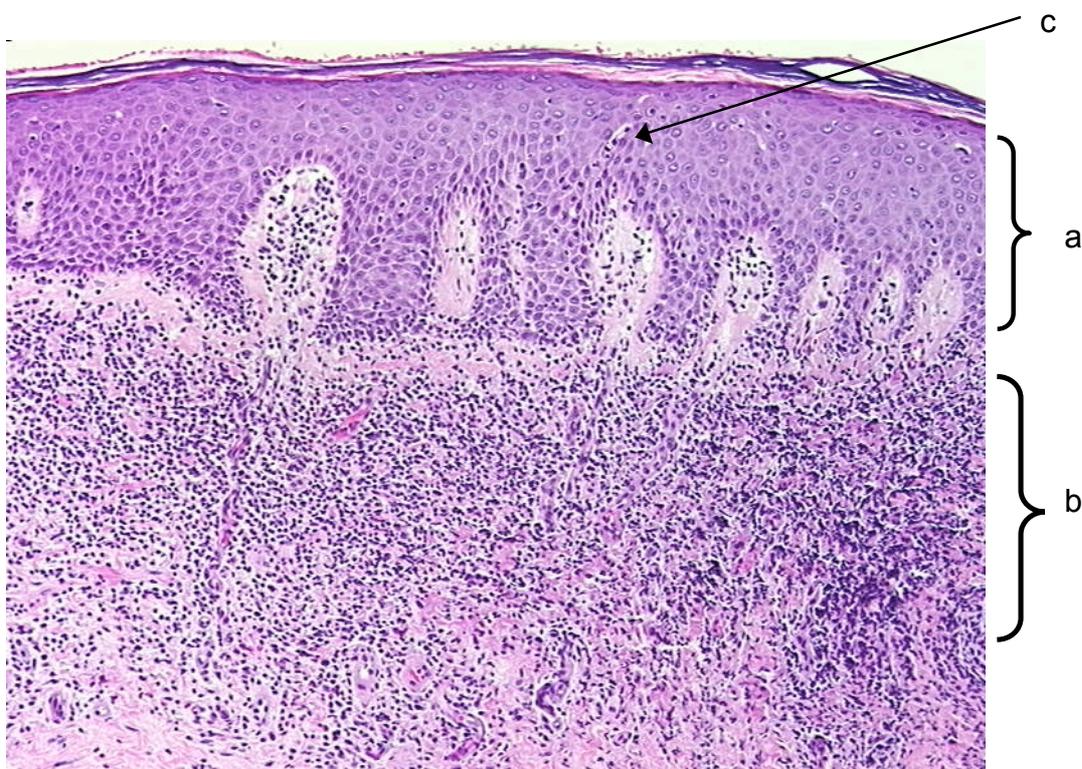


Abb. 1: Histopathologie der Mycosis fungoides: (a) Akanthose des Epithels, (b) bandartiges lymphozytäres Infiltrat, (c) Epidermotropismus.

Die Immunphänotypisierung ist im Zusammenhang mit der Histologie ein weiteres diagnostisches Hilfsmittel.

Immunhistologische Studien an typischen MF-Hautbiopsien zeigten T-Zell-Prädominanz (CD2+, CD3+, CD5+) mit hohem Anteil an T-Zellen mit reifem Phänotyp CD4+CD45-RO+ (Memory-Helfer-T-Zelle).

Der aussagekräftigste immunphänotypische Marker ist das Vorhandensein von über 90% CD4 positiven Zellen (45).

Die Expression des frühen T-Zell Markers CD7 wird im Rahmen der MF möglicherweise verringert (49), ist jedoch in einem Drittel der Fälle dennoch festzustellen (21).

Neben der Histologie und Immunhistochemie, liefert die Klonalitätsanalyse des T-Zell-Rezeptorgens, auf die noch näher eingegangen werden soll, einen wichtigen Beitrag zur Diagnosestellung.

Die Untersuchung der Klonalität einer Zellpopulation ist sinnvoll, da die meisten Lymphome monoklonal sind, das heißt, dass alle Zellen von derselben Mutterzelle abstammen. Im Gegensatz dazu werden entzündliche Erkrankungen im Allgemeinen als polyklonal betrachtet. Ihre Zellen stellen die Nachkommenschaft vieler Vorläuferzellen dar.

1.1.5. Staging und Therapie

Als Standard in der Stadieneinteilung der MF und anderer CTCL (CTCL= Cutane T-Zell Lymphome) gilt ein 1978 vom CTCL-Workshop des National Cancer Institute vorgeschlagenes TNM-System. Es berücksichtigt das Ausmaß der Hautbeteiligung, den möglichen Befall von Lymphknoten oder viszeralen Organen sowie das Vorkommen atypischer Zellen im Blut. Es werden 4 Stadien unterschieden.

Stadium I setzt das Fehlen einer extrakutanen Beteiligung voraus. Umfassen die Hautveränderungen (ekzematöse Herde oder Plaques) weniger als 10% der Körperoberfläche, spricht man von Stadium IA (T1N0M0), bei mehr als 10% von Stadium IB (T2N0M0).

Das Vorliegen tastbarer Lymphknoten entspricht dem Stadium IIA (T1/2N1M0) während das Stadium IIB (T3N0/1M0) dem Tumorstadium ohne extrakutane Beteiligung entspricht. Beobachtet man eine Erythrodermie mit oder ohne palpable Lymphknoten, liegt Stadium III vor. Stadium IV liegt vor bei histologisch gesichertem Lymphknoten- oder Organbefall.

Die Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group gibt für die MF eine 5-Jahres Überlebensrate von 87% an (47).

Die Erkrankung wird in Abhängigkeit von ihrem Stadium behandelt.

Die von der deutschen dermatologischen Gesellschaft empfohlenen stadienabhängigen Therapieschemata umfassen

- Psoralen und UV-A (PUVA): Psoralen bildet, nach Photoaktivierung aus Methoxypsoralen, Vernetzungen der DNA-Stränge und interferiert auf diese Weise mit der DNA-Synthese.
- Ganzkörper-Elektronentherapie: „Schnelle Elektronen“ mit einer Eindringtiefe von 1 cm werden in Form einer Ganzkörperbestrahlung sowie zur Behandlung umschriebener Areale und tumoröser Lymphominfiltrate verwendet.
- Interferon- α : Vor allem frühe Stadien der MF sprechen auf die Interferon- α Therapie an.
- Mono- und Polychemotherapie: Gebräuchliche Schemata wie COP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison) oder CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison) spielen erst in fortgeschrittenen Stadien in Zusammenarbeit mit hämatonkologischen Zentren eine Rolle.
- Extrakorporale Photopherese (ECP): Hier wird die orale Einnahme von 8-Methoxypsoralen mit einer UV-A-Bestrahlung der korpuskulären Bestandteile des Blutes außerhalb des Körpers kombiniert.
- Topische Chemotherapie: Die Therapie mit Stickstofflost HN2 (Mechlorethamin) oder Carmustin ist vor allem in den USA und Skandinavien gebräuchlich und vermag vor allem bei initialen Stadien der MF komplette Remissionen zu erzielen. In der BRD hat sich die Verwendung topischer Chemotherapeutika jedoch nicht durchgesetzt (24) und ist nicht zugelassen.

Eine frühe aggressive Therapie mit kombinierter Chemotherapie und Bestrahlung zeigte zwar höhere Ansprechraten, brachte jedoch keinen

Überlebensvorteil gegenüber Patienten, die mit einer konservativen topischen Therapie behandelt wurden (25).

1.2. Die T- Zell Entwicklung

Die T-Zellen-Reifung findet im Thymus statt. Während der präthymischen Phase entwickeln sich pluripotente Stammzellen zu lymphatischen Vorläuferzellen. Dieser Prozess beginnt während der Ontogenese gleichzeitig mit der Hämatopoese in der fetalen Leber und Milz, um in der Kindheit im Knochenmark fortgesetzt zu werden. Die Vorläuferzellen erreichen den Thymus über das Blut und wandern in dessen äußeren Kortex ein, wo sie rasch proliferieren.

Während der weiteren Entwicklung wandern sie in tiefere Schichten des Kortex, bis schließlich im Mark die letzte Reifung stattfindet. Etwa 95% dieser Thymozyten werden aussortiert, bevor sie das Mark erreichen. Nur Zellen, die in der Lage sind, mit Peptiden zu interagieren, die an die MHC-Moleküle Klasse I oder II gebunden sind, können sich weiterentwickeln. Diese positive Selektion scheint hauptsächlich durch Interaktion mit Thymusepithelzellen bestimmt zu sein (27). Positive Selektion ist entscheidend für das T-Zell-Repertoire und die frühe klonale Selektion. Andererseits werden T-Zellen, deren Rezeptor zu stark an MHC-Antigene bindet, aussortiert, da sie, in das Blut freigesetzt, eine Autoimmunantwort bewirken können. Bei dieser negativen Selektion spielen Makrophagen und dendritische Zellen eine wichtige Rolle (27).

1.3. Oberflächenmarker und ihre Veränderung während der T-Zell-Entwicklung

Viele der funktionell relevanten Oberflächenmoleküle von Immunzellen haben mehrere Bezeichnungen. Dies beruht auf der historischen Entwicklung, in deren Verlauf viele Moleküle gleichzeitig von unabhängigen Arbeitsgruppen entdeckt und beschrieben wurden. Zur Vereinfachung wurde eine international verbindliche Nomenklatur geschaffen: Die sogenannte CD-Nomenklatur (CD = cluster of differentiation). Grundlage ist die Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper, die das jeweilige Oberflächenmolekül zweifelsfrei definieren.

Die Thymozyten-Differenzierung läuft in einer Reihe von Schritten ab, die jeweils durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker und Interaktion mit anderen Zellen gekennzeichnet sind (siehe Abb. 2, S. 16).

Die lymphatischen Vorläuferzellen, die sich noch außerhalb des Thymus befinden, tragen die Merkmale HLA-DR und CD34. Nachdem sie in den Thymus eingewandert sind, verlieren sie diese Merkmale.

Das CD7-Antigen, ein membrangebundenes Glykoprotein (Größe 40 kD), ist das früheste T-Zell-spezifische Antigen, das von Prä-Thymozyten exprimiert wird, und es ist der einzige frühe Marker, der während der Differenzierung erhalten bleibt. Die Bedeutung, die CD7 in der T-Zell-Entwicklung hat, ist unklar.

Desweiteren exprimieren unreife Thymozyten mit CD2 ein Adhäsionsmolekül, das für den direkten Kontakt zwischen T-Zellen und anderen immunkompetenten Zellen von Bedeutung ist. Die Aufgabe des nun ebenfalls exprimierten CD5-Antigens ist die Vermittlung transmembraner Signale. Es findet sich auch später auf 95% der Thymozyten und 72% der peripheren, im Blut zirkulierenden Lymphozyten. Fast alle unreifen Thymozyten exprimieren zu diesem Zeitpunkt CD38 (6, 42), das mit der T-Zell-Entwicklung assoziierte Antigen und CD71, den Transferrin-Rezeptor.

In frühen Stadien werden Thymozyten als doppelt negativ bezeichnet, da sie weder CD4- noch CD8-Marker exprimieren.

Thymozyten der zweiten Entwicklungsstufe (common thymocyte) sind charakterisiert durch den Verlust von CD71, den Erwerb von CD1 und die Koexpression von CD4 und CD8. Die Entstehung dieser doppelt positiven Zellen wird getriggert durch den Prä-T-Zell-Rezeptor (cCD3) (3).

Das CD4-Antigen, ein einkettiges, transmembranes Glykoprotein (MG 59 kDa), steuert als Korezeptor die Bindung des T-Zell-Rezeptors an MHC-Klasse-II-Moleküle und ist beteiligt an der T-Zell-Aktivierung. CD8 dient als Korezeptor für die Bindung an MHC-Klasse-I-Moleküle.

Die Population, die gleichzeitig CD1, 2, 4, 5, 7, 8 und CD38 exprimiert, bildet 70% der Thymozyten.

Mit fortschreitender Entwicklung verlieren die Zellen CD1 und erhalten das reife T-Zell-Antigen CD3. Dieses ist ein Komplex aus den drei Ketten γ , δ und ϵ , die nicht kovalent mit dem T-Zell-Rezeptor verbunden sind. CD3 ist beteiligt an der transmembranen Signalübertragung. Wenn die nun reifen Zellen den Thymus verlassen, exprimieren sie kein CD38 mehr und tragen entweder CD4 (zu 2/3) oder CD8 (zu 1/3) auf ihrer Oberfläche. CD4-Zellen verfügen hauptsächlich über Helfer- und Inducer-Funktion, während sich CD8-Zellen durch zytotoxische Funktion auszeichnen (11).

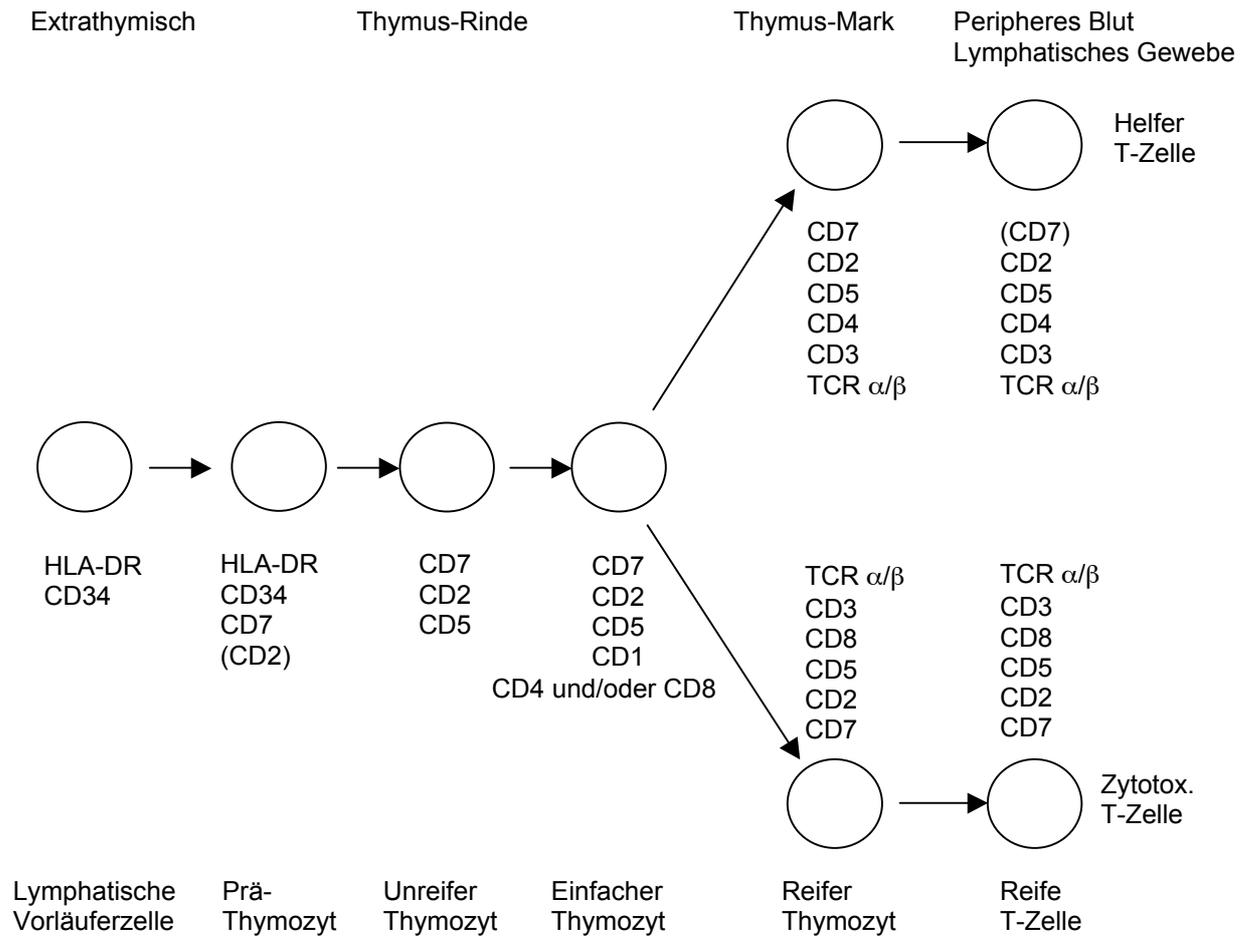


Abb. 2: Die T-Zell-Entwicklung (stark modifiziert nach Abbas AK, Lichtman AH in: Cellular and Molecular Immunology, 5th Edition, Oxford, Saunders Verlag, 2005; 151-152.), ausführliche Erläuterung im Text unter 1.3.

1.4. T-Zell-Rezeptorkomplex und Rearrangement

Die T-Zell-Rezeptoren (TCR), die das Fremdanigen an der Oberfläche nur in Zusammenhang mit den körpereigenen MHC-Antigenen (MHC-Restriktion) erkennen und spezifisch binden können, bestehen aus verschiedenen Untereinheiten (α , β , γ und δ). Der TCR 2, der auf der Mehrheit der

zirkulierenden Blutzellen vorkommt, stellt ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Fremdantigenen. Der sehr viel seltener vorkommende TCR 1 besteht aus einer γ - und einer δ - Kette. T-Zellen mit dem γ/δ -Rezeptor agieren überwiegend als zytotoxische Zellen und treten beim Mensch gehäuft im Epithel der Haut und des Magen-Darm-Trakts auf. Die endgültige Funktion dieser T-Zell-Subpopulation ist jedoch bis heute nicht geklärt.

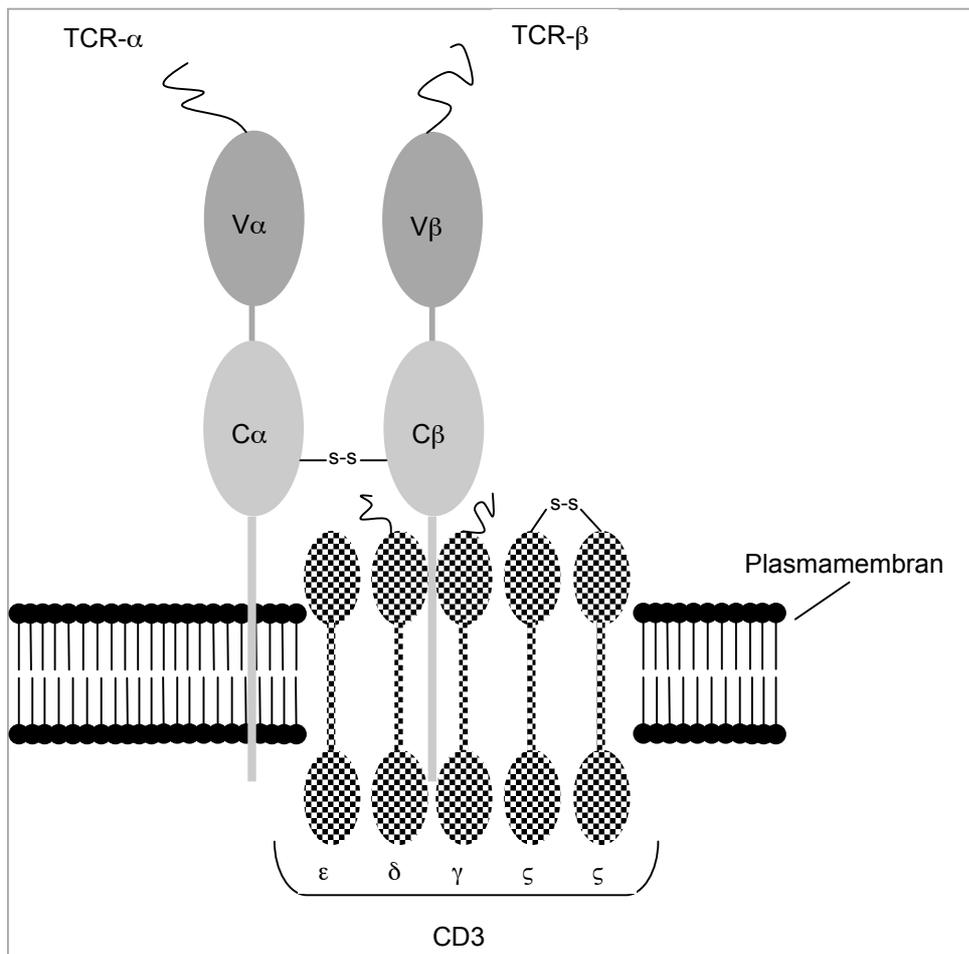


Abb. 3: Der T-Zell Rezeptor 2

T-Zellen exprimieren entweder α/β - (wie hier) oder γ/δ -Heterodimere als T-Zell-Rezeptoren, wobei die beiden Ketten kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die α -, β -, γ - und δ -Kette bestehen jeweils aus einem nach außen gerichteten variablen (v) Bereich, welcher der Antigenerkennung dient und einem konstanten (c) Bereich, der die Kette in der Zellmembran verankert. In der Membran ist der T-Zell-Rezeptor mit dem Molekülkomplex „CD3“ assoziiert, der, wie bereits erwähnt, für die Signalübertragung in das Zellinnere verantwortlich ist. Auch die ζ -Kette dient der Signalübertragung.

1.5. Genetische Grundlagen der T-Zell-Rezeptorvielfalt

Die genetische Information für die vier verschiedenen Ketten der T-Zell-Rezeptoren ist auf vier Genloci zusammengefasst. Die Genloci für die α - und δ -Ketten liegen auf Chromosom 14, diejenigen für die β - und γ -Ketten liegen auf Chromosom 7. Die Genloci enthalten jeweils kettenspezifische Segmente, die für die entsprechenden Teile der T-Zell-Rezeptorketten kodieren.

Diese V- (variablen), J- (joining), D- (diversity) und C- (konstanten) Segmente lassen sich in unzählig vielen Kombinationen zusammensetzen und ermöglichen eine hohe Antigen-Spezifität der T-Zell-Rezeptoren. Die Genumlagerungsprozesse (das Rearrangement) der TCR-Gene verlaufen parallel zu den Reifungsprozessen der T-Zellen und erfolgen unter Mithilfe der Enzyme terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT), Endo- und Exonuklease.

Während der Ontogenese kommt es zur Umlagerung der TCR- γ - und - δ -Gensegmente, anschließend wird der TCR der β - und α -Gensegmente neu kombiniert.

Die Umlagerung der Gensegmente, die für die α - und γ -Kette kodieren, erfolgt in einem Schritt. Dabei wird zwischen die umgelagerten V- und J-Segmente eine in Zusammensetzung und Länge zufällige Anzahl von Nukleotiden eingebaut (N-Region).

Demgegenüber erfolgt das Rearrangement der für die β - und δ -Kette kodierenden Segmente in 2 Schritten.

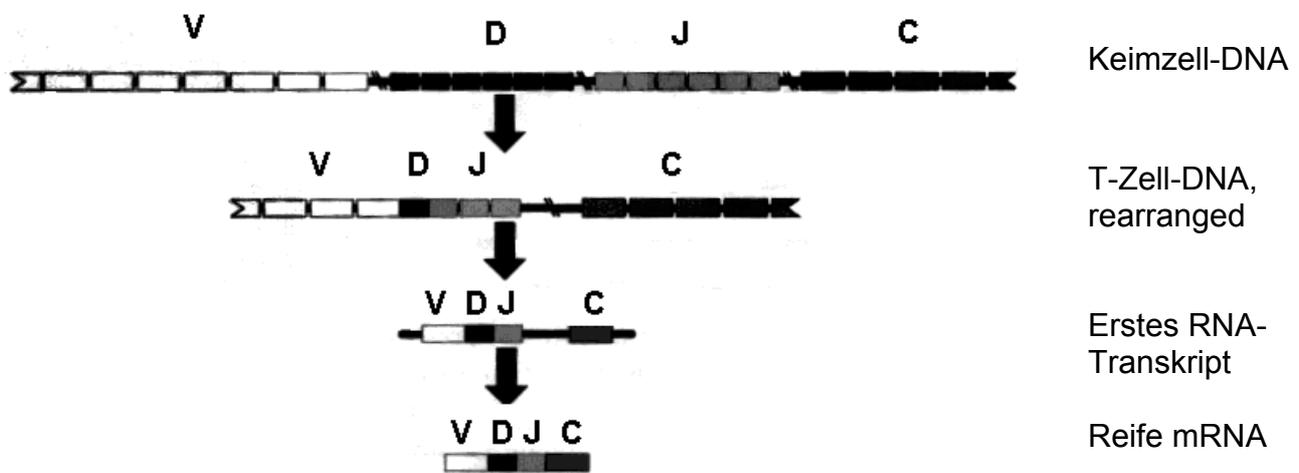


Abb. 4: Schematische Darstellung des Rearrangements anhand des T-Zell-Rezeptor-Gens (β - und δ -Kette).

Nach Aneinanderlagerung und Umlagerung eines D- und J-Bereichs wird ein V-Segment angelagert. Darüber hinaus werden N-Regionen zwischen die umgelagerten Gensegmente eingefügt, die in jeder T-Zelle in Zusammensetzung und Länge unterschiedlich sind.

Auf diese Weise entsteht ein hypervariabler Genabschnitt, der in jeder normalen T-Zelle unterschiedlich ist und somit einen molekularbiologischen Fingerabdruck darstellt.

1.6. Klonalitätsuntersuchung

Da man annimmt, dass alle neoplastischen T-Zellen aus einer einzigen transformierten Zelle hervorgehen, weisen sie auch denselben hypervariablen Bereich auf. Daraus ergaben sich unterschiedliche Verfahren zum Nachweis klonaler T-Zellpopulationen.

Die Southern-Blot Methode ist zwar der „Goldstandard“ zur Bestätigung von Klonalität, hat jedoch mehrere Nachteile. So muss die monoklonale Zellpopulation zu einem Prozentanteil von ca. 3-5% der Gesamtpopulation

der Tumorzellen vorliegen (44). Des Weiteren sind die Hybridisierungsschritte sehr zeitaufwendig und frisches oder gefrorenes Material muss zur Verfügung stehen (29). Im Gegensatz dazu können für PCR-basierte Methoden auch formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Biopsate untersucht werden, wobei auch keine Hybridisierungsschritte notwendig sind. Die eingeschränkte Sensitivität der Southern-Blot Methode ist vor allem problematisch bei der Analyse einer Läsion, die nur ein spärliches lymphatisches Infiltrat hat. Die Tumor-Zell-Dichte ist hier oft zu niedrig, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen.

Die meisten T-Zell-Lymphome zeigen in der γ -Kette des TCR ein Rearrangement, obwohl der γ/δ -TCR nicht an der Oberfläche exprimiert wird. Es werden überwiegend Rearrangements der γ -Kette des TCR untersucht, da der Genlocus im Gegensatz zu den Genloci für die β - und δ -Kette eine begrenzte Anzahl von V- und J-Segmenten aufweist und es dadurch einfacher ist, spezielle Primer herzustellen die alle V- und J-Segmente abdecken.

Die PCR-basierten Methoden zeigten im Bezug auf den Nachweis von Monoklonalität bei kutanen Lymphomen eine Sensitivitätsrate von 92% (18). Normale und reaktive T-Zellen zeigen hingegen anstelle von monoklonalen Rearrangements verschieden große hypervariable Bereiche, die sich in der PCR-Analyse als Bandengemisch (= polyklonal) darstellen.

Obwohl Klonalität auch im Rahmen von benignen Hauterkrankungen wie Lichen planus (36) oder Lichen sclerosus et atrophicus (28) vorkommt, ist die Spezifität hoch. Vor allem zur Unterscheidung von Lymphomen und Pseudolymphomen, die sich anhand anderer Kriterien nur schwer differenzieren lassen, ist die Klonalitätsanalyse hilfreich (37). Bei der Ergebnisinterpretation muss jedoch stets berücksichtigt werden, dass Klonalität nicht mit Malignität und Fehlen von Klonalität nicht mit Benignität gleichgesetzt werden darf. So kommt beispielsweise bei malignen Lymphomen vom T/NK-Zelltyp praktisch nie ein monoklonales Rearrangement vor (23). Des Weiteren können Mutationen oder

Translokationen dazu führen, dass ein monoklonales Rearrangement fälschlicherweise nicht nachweisbar ist.

Ergebnisse von Klonalitätsanalysen sind also immer im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild, der Histologie und Immunhistologie zu interpretieren.

1.7. Immunhistochemie

Zur Lokalisation von Antigenen in Gewebsschnitten steht heute eine Vielzahl immunenzymatischer Färbetechniken zur Verfügung.

Bevorzugte Verwendung findet die Enzym-Immunkomplex-Methode, da sie zu den empfindlichsten immunhistochemischen Techniken gehört.

Diese Methode nutzt den präformierten löslichen Enzym-Antienzym-Immunkomplex aus Antigen (= Enzym) und den dagegen gerichteten Antikörpern. Die APAAP-Methode nutzt einen Immunkomplex aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem Antikörper gegen die alkalische Phosphatase (**A**lkalische **P**hosphatase - **A**nti-**A**lkalische **P**hosphatase).

Indem man Enzym im Überschuss zuführt und entsprechende Präzipitate entfernt, erhält man einen löslichen Enzym-Anti-Enzymkomplex. Die Reagenzien werden in folgender Reihenfolge zum Gewebe gegeben: unkonjugierter Primärantikörper, unkonjugierter Sekundärantikörper, lösliche Enzym-Anti-Enzymkomplexe und schließlich die Substratlösung.

Der Primärantikörper sowie der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes müssen aus derselben Spezies entstammen, so dass der Brückenantikörper sie miteinander verbinden kann.

Der Brückenantikörper hat zwei Anforderungen zu erfüllen. Zum einen muss er gegen Immunkomplexe der Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper als auch die den Immunkomplex bindenden Antikörper stammen. Zum anderen muss er im Überschuss vorliegen, so dass ein F(ab)-Arm an den Primärantikörper bindet, während der andere zur Anlagerung des

Antikörpers aus dem Enzym-Immunkomplex zur Verfügung steht. Das Substrat wird anschließend von der alkalischen Phosphatase in den Farbstoff umgesetzt. Die hohe Sensitivität dieser Methode ist vor allem auf eine größere Zahl von Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung stehen, zurückzuführen.

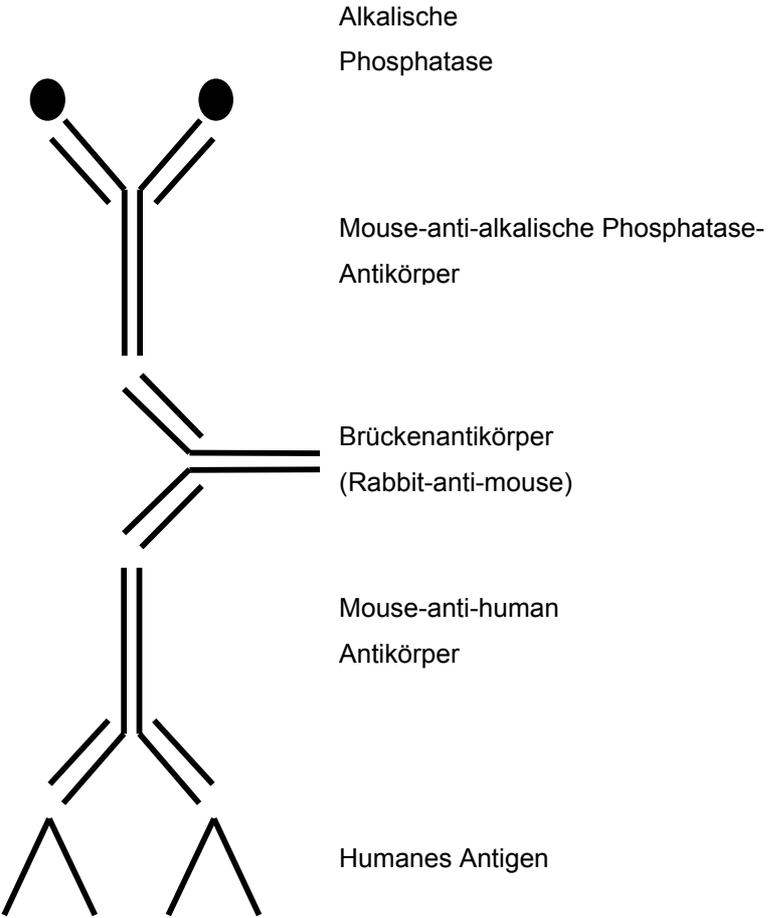


Abb. 5: APAPP-Methode

Für den polyklonalen Antikörper gegen das CD3-Antigen ergibt sich eine besondere Situation. Da dieser Antikörper als einziger der Verwendeten aus dem Kaninchen stammt, muss zwischen ihm und dem Brückenantikörper noch ein verbindender (Sekundär-) Antikörper geschaltet werden.

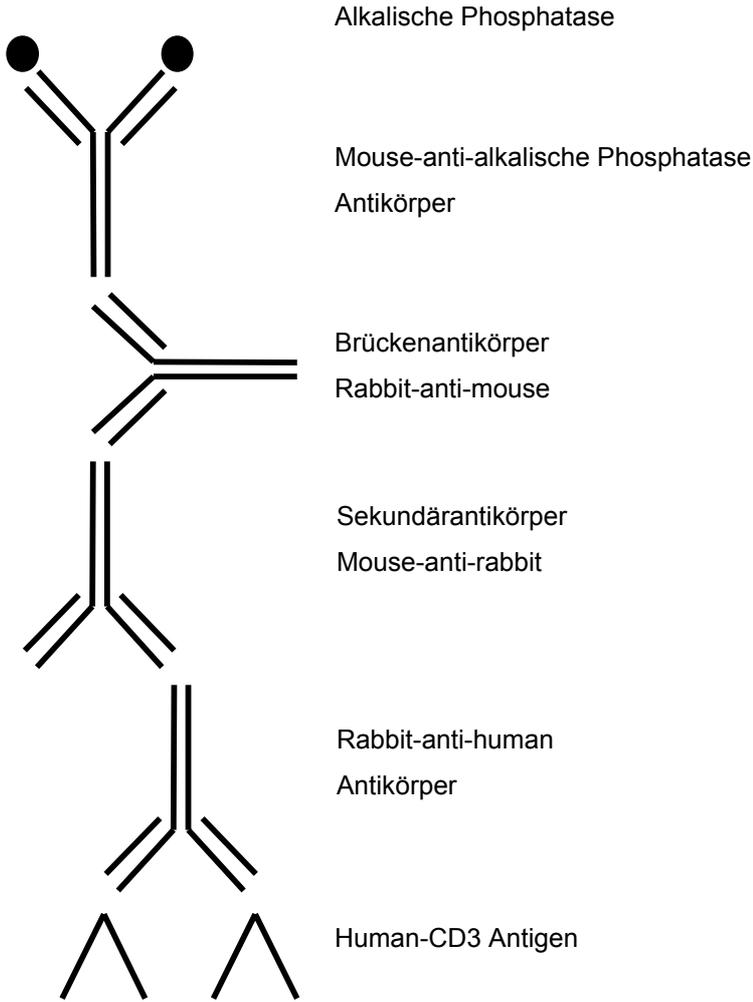


Abb. 6: CD3-Komplex

1.8. Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion oder Laser-Capture-Mikrodissection (LCM) wurde von Wissenschaftlern des National Institute of Health (NIH) in Bethesda (USA) entwickelt und in Zusammenarbeit mit der Industrie (Arcturus) kürzlich zur Serienreife gebracht.

Schon lange zuvor fanden verschiedenste Methoden der Mikrodissektion Anwendung (8). Es wurde versucht, durch Ablation umliegendes Gewebe zu zerstören, um dann die Zellen von Interesse per Mikromanipulation zu sammeln. Mit verschiedensten Instrumenten versuchte man die Zellen aus dem histologischen Präparat herauszulösen. Die meisten dieser Verfahren haben zur Folge, dass die Morphologie des umliegenden Gewebes unwiederbringlich verloren ist und es nicht mehr für weiterführende Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene zur Verfügung steht.

Die LCM erfüllt hingegen die Anforderungen, welche im Bezug auf Schnelligkeit, Präzision und Vielseitigkeit an die moderne molekulare Diagnostik gestellt werden.

In Kombination mit empfindlichen analytischen Methoden wie der PCR hat die Laser-Mikrodissektion histologischer Schnitte in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, da mit ihrer Hilfe ausgewählte Zellpopulationen aus komplexen Geweben gewonnen werden können.

Diese Zellpopulationen wären durch mechanische Aufarbeitung und herkömmlichen Verdau nicht vom umliegenden Gewebe zu trennen.

Die Verwendung von sterilem Transferfilm bei der LCM reduziert die Gefahr einer potentiellen Kontamination, was für die PCR-basierte Diagnostik essentiell ist.

Jedes, wenn auch noch so hoch entwickelte Verfahren, Gene zu analysieren, ist von begrenztem Wert, wenn die zu untersuchende DNA oder RNA nicht von reinen Zellpopulationen stammt, die durch speziellen Antigen-Nachweis ausfindig gemacht werden können. Gerade in Verbindung mit immunhistologischen Färbemethoden haben wir in der LCM eine

hochsensitive Methode, die es uns beispielsweise erleichtern kann, eine Aussage über das Stadium der MF zu treffen.

Eine Überlagerung des Amplifikationsproduktes durch reaktive Lymphozyten, wie sie sowohl bei der Southern-Blot Methode als auch bei der PCR von extrahierter Gesamt-DNA aus Zellpopulationen vorkommt, wird durch die LCM vermieden.

Ein weiterer Vorteil ist, dass das übertragene Gewebe seine ursprüngliche Morphologie behält und so die mikroskopische Überprüfung der Spezifität des geernteten Gewebes erlaubt.

Während die herkömmliche Klonalitätsanalyse der γ -Kette des TCR-Gens von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben ein langwieriges Verfahren darstellt, welches bis zum Gewinn von amplifizierbarer DNA ca. fünf Arbeitstage benötigt, kann durch Lasermikrodissektion die DNA innerhalb weniger Stunden extrahiert werden.

Gerade da im Bezug auf Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung noch vieles unklar ist, arbeiten viele Forschungsgruppen an der Frage, in welchen mikroanatomischen Kompartimenten sich die reaktiven und die malignen Zellen während des Krankheitsverlaufes aufhalten. Hierzu kann die LCM wie keine andere Methode einen entscheidenden Beitrag leisten.

In Zukunft ist vorstellbar, dass durch die Klonalitätsanalyse mittels LCM und PCR das Ansprechen auf Therapien kontrolliert werden kann.

Auch das frühzeitige Erkennen eines Rezidives wäre bei der MF als potentiell tödlicher Erkrankung von unschätzbarem Wert.

1.9. Ziel der Untersuchung

Man ist der Auffassung, dass die malignen Zellen der MF in den meisten Fällen CD3- und CD4-positiv sowie CD8- und CD30-negativ sind (31). Der Phänotyp CD8-positiv und CD4-negativ ist selten, wobei eine CD8-positive MF häufiger mit einem progressiven Verlauf vergesellschaftet zu sein scheint als eine CD4-positive MF (1). In fortgeschrittenen Stadien der MF kann es zu

einem aberranten Phänotyp, mit Verlust der Pan-T-Zell-Marker CD2, CD3 und CD5 kommen.

Um eine mögliche Korrelation der neoplastischen (klonalen) Zellen mit dem Immunphänotyp nachzuweisen, untersuchten wir mit Hilfe von LCM gewonnene Zellen, die CD3, CD4, CD5, CD7 und CD8 exprimierten, separat im Hinblick auf Klonalität (γ -Kette des T-Zell- Rezeptorgens).

Eine weitere Frage die uns beschäftigte war, ob die klonale Entwicklung auf eine bestimmte Lymphozytensubpopulation und damit auf ein bestimmtes Stadium der Lymphozytenentwicklung zurückzuführen sei. Ein Ziel war, durch Feststellung des klonalen Rearrangements einen Rückschluss auf das molekularbiologische Stadium der Erkrankung zu ziehen.

Ein weiteres Augenmerk galt der Frage, unter welchen Bedingungen durch die Lasermikrodissektion eine höhere Sensitivität der Klonalitätsanalyse erreichbar ist.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

In die Untersuchung wurden Biopsien von 16 Patienten/-innen eingeschlossen, die sich in der ambulanten und stationären Betreuung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München befanden. Bei 13 Patienten/-innen lag eine klinisch und histopathologisch gesicherte Mycosis fungoides vor. Bei einem Patienten lag klinisch ein Frühstadium einer MF vor. Ein weiterer Patient wies histologisch nicht die klassischen Kriterien für MF auf. Bei monoklonalem Infiltrat in der Klonalitätsuntersuchung kommt in diesem Fall differentialdiagnostisch eine Dermatitis in Frage (Pseudolymphom). Ein Patient, der als Referenzfall diente, zeigte ein atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat.

Als Untersuchungsmaterial dienten in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Hautbiopsien, die in den Jahren 1998 bis 2001 entnommen wurden. Die folgende Tabelle enthält allgemeine Daten über die Patienten.

Tabelle 1: Patientenübersicht

Pat. Nr.	Diagnose	Stadium
1	MF	
2	MF	
3	MF	
4	Dermatitis	
5	MF	Tumorstadium
6	MF	Tumorstadium
7	MF	
8	MF	Plaquestadium
9	atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat DD T-Zell Lymphom	
10	MF	
11	MF	
12	MF	
13	MF	
14	MF	
15	MF	Patchstadium
16	atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat	

2.2. DNA- Extraktion aus Paraffingewebe

Für die DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebetteten Gewebeproben verwendeten wir eine abgeänderte Version der von Shibata publizierten Methode (40).

Arbeitsablauf:

1. Pro Paraffinblock wurden mit dem Mikrotom 20-25 10µm dicke Schnitte angefertigt.
2. Nach Zugabe von 1 ml Xylol wurde die Probe 30 Minuten am Rotator gewendet, wobei das Paraffin aus dem Gewebe herausgelöst wird. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 14.000 U/min. wurde der Überstand entfernt und dieser ganze Arbeitsschritt noch ein bis zweimal wiederholt.
3. Um das Xylol zu entfernen wurde, durch jeweils 15 min. mischen auf dem Rotator, zweimal mit Ethanol 100% gewaschen, anschließend erfolgte das erneute Zentrifugieren und Abpipettieren.
4. Das entparaffinierte Gewebe wurde über Nacht bei 37°C vollständig getrocknet, da Ethanolreste die Aktivität der Proteinase K hemmen würden.
5. Es folgte die Zugabe von ca. 150 µl Digestionspuffer mit einem 10% Anteil an Proteinase K.
6. Die Proben wurden für 2 Tage in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert, wobei nach dem ersten Tag nochmals die gleiche Menge Proteinase zugegeben wurde.

7. Um die herausgelöste DNA von den Gewebsresten zu trennen, wurde das Lysat für 10 Minuten bei höchster Umdrehung zentrifugiert und sodann der DNA-haltige Überstand in ein neues Gefäß (tube) überführt.
8. Um die Proteine und Enzyme von der DNA zu trennen, wurde eine äquivalente Menge eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches hinzugegeben. Nach 30 Minuten Mischen am Rotator erfolgte wiederum eine Zentrifugation für 10 Minuten.
9. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne Mitnahme von Interphase, abpipettiert und in ein neues Gefäß gegeben, wobei das Volumen erfasst wurde. Anschließend Zugabe des doppelten Überstandsvolumens von Ethanol 100% und 1/10 des Gesamtvolumens der wässrigen Phase von 3-molarer Natriumacetatlösung (pH 5,2). Mischen der Proben und Präzipitation der DNA bei -20°C über Nacht.
10. Am folgenden Tag wurde die Probe für 10 Minuten bei 4°C und höchster Umdrehung zentrifugiert, wodurch sich ein Pellet am Boden absetzte.
11. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und DNA-Reste vom Tube durch Fingerschnippen gelöst. Es folgte wiederum eine 10-minütige Zentrifugation, der Überstand wurde sodann verworfen.
12. Nach vollständiger Trocknung bei 37°C im Heizblock wurde das Pellet je nach Größe in 10-15 µl sterilem Aqua dest. gelöst. Die so gewonnene DNA wurde anschließend in eine PCR eingesetzt und dabei meist 1:10 verdünnt.

Verwendete Geräte und Chemikalien

Mikrotom:	Firma Reichert-Jung 2030 (Cambridge Instruments GmbH)
Probenröhrchen (1,5 ml):	Firma Eppendorf
Pipetten:	Firma Nichiryo und Firma Gilson „Pipetman“
Pipettenspitzen Prä-PCR: (mit Aerosolschutz)	Firma Nerbe Plus
Pipettenspitzen Post-PCR: (ohne Aerosolschutz)	Firma Sarstedt
Zentrifuge:	Hereaus Biofuge 13
Heizblock:	Eppendorf Thermomixer 5436
Xylol:	Mallinckrodt Baker B.V., Holland
Ethanol (70%, 100%):	Mallinckrodt Baker B.V., Holland
Digestionspuffer:	Ansatz für 100 ml: 10 ml TRIS-HCL (1 molar, pH 8,0) 1 ml EDTA-Lösung (0,5 molar, pH 8,0) 0,5 ml Tween 20

88,5 ml RNase-, DNase freies PCR
Wasser (dH₂O)

Proteinase K:

Firma InVitrogen
Stammlösung 10 mg/ml
zu einem Anteil von 10%
in Digestionspuffer

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol:
(Verhältnis 25:24:1)

Carl Roth GmbH + Co,
Karlsruhe

3-molares Natriumacetat:

Sigma;
Natriumacetate buffer solution
(3 molar, pH 5,2)

2.3. PCR und Gelelektrophorese

Um einen möglichst großen Bereich der γ -Kette des T-Zell-Rezeptorgens abzudecken, haben wir Primer der vier Hauptgruppen der variablen Regionen (V γ 1-8, V γ 9, V γ 10 und V γ 11) mit einem Primer-Mix bestehend aus vier Joining-Primern (J γ 2, J γ p, J γ p1 und J γ p2) kombiniert (37). Die Genabschnitte V γ 1- V γ 8 wurden anhand des Konsensusprimers V γ 2 analysiert (18).

Arbeitsablauf:

1. Auftauen und Abzentrifugieren der benötigten Reagenzien (Primer, dNTP's, Mg²⁺-Puffer, H₂O für PCR, AmpliTaq-Gold), die dann wieder auf Eis gestellt wurden. Um Kontamination zu vermeiden, wurde peinlichst auf saubere Arbeits- und Stellflächen für die Tubes geachtet.

- Die sterilen 0,2 ml PCR-Probenröhrchen wurden mit Handschuhen entnommen und beschriftet, ebenso die Röhrchen für den PCR-Ansatz (Master-Mix).
- Für den Master-Mix der TCR- γ -PCR (50 μ l PCR-Endvolumen für LCM; Hot-Start-PCR) ergaben sich folgende Volumina:

Primer-Mix :	10,0 μ l
PCR-Puffer (1,5mM Mg ²⁺):	10,0 μ l
dNTP`s (100 μ M):	2,0 μ l
dH ₂ O:	26,7 μ l
AmpliTaq Gold (1,5 U):	0,3 μ l

Die in Klammern angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Konzentration im Endvolumen.

Für jedes Probenröhrchen ergab sich ein Volumen von 49 μ l.

Für die jeweilige PCR wurden diese Volumina mit der Anzahl der Proben plus einer Reserve multipliziert.

- Von dem Mix wurden jeweils 49 μ l in die vorbereiteten Röhrchen pipettiert. Dabei wurde die ebenfalls sterile sowie DNase und RNase-freie Pipettenspitze jedes Mal gewechselt.
- Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden gut gemischt und zentrifugiert. Jeweils 1 μ l wurde zu dem PCR-Ansatz hinzupipettiert, wobei nach jeder der verschiedenen DNA-Proben ein Handschuh- und Pipettenspitzenwechsel durchgeführt wurde.
- Als Positivkontrollen wurden je 1 μ l der DNA der malignen T-Zell-Reihen Jurkat oder HSB2, sowie als Negativkontrollen 1 μ l dH₂O pipettiert.

PCR-Puffer: 10-fach PCR-Puffer
150 mM TRIS-HCL pH 8,0
500 mM KCl
1,5 mM Mg²⁺

dNTP's: Firma Perkin Elmer
Stammlösung 10mM

PCR-Wasser: InVitrogen

Positivkontrolle Jurkat : für V_γ2 und V_γ11

Positivkontrolle HSB2: für V_γ9 und V_γ10

Primer für T-Zell Rezeptor- γ -PCR:

Sequenz 5' → 3'

V_γ2: TACATCCACTGGTACCTACACCAG (Konsensusprimer für V_γ1- V_γ8)

V_γ9: GAAAGGAATCTGGCATTCCGTCAG

V_γ10: AAGCAACAAAGTGGAGGCAAGAAAG

V_γ11: AGTAAAAATGCTCACACTTCCACTTC

J_γp: AAGCTTTGTTCCGGGACCAAATAC

J_γp1: GAAGTTACTATGAGCTTAGTCCCTT

J_γp2: GAAGTTACTATGAGCCTAGTCCCTT

J_γ2: TACCTGTGACAACAAGTGTTGTTC

Durchführung der Gelelektrophorese:

Arbeitsablauf:

1. Zwei Glasplatten wurden, nach Reinigung mit Ethanol, mit Klammern aneinander fixiert, wobei durch Spacer ein 1,2 mm breiter Hohlraum gebildet wurde.

2. Anschließend wurde das Gel nach folgender Rezeptur hergestellt:

TBE-Puffer (10-fach): 5,0 ml

Acrylamid/Bis: 7,5 ml
(40%ig; 19:1 Vernetzungsgrad)

dH₂O: 37,5 ml

Dadurch erhielt man ein 6%iges Polyacrylamidgel mit einem Volumen von 50 ml und einer Dicke von 1,2 mm.

Zur Aktivierung und schnelleren Polymerisation des Acrylamids wurde zugegeben:

10%iges Ammoniumpersulfat: 250 µl

TEMED: 20 µl

3. Nach Gießen des Gels und Einlegen des Kammes, wobei sich keine Luftblasen im Polymer befinden sollten, ließ man es für ca. eine Stunde erhärten.
4. Die PCR-Proben wurden vorbereitet, indem nach kurzer Anzentrifugation „Blue–Juice“ (Gelladepuffer), und zwar 10% des Probenvolumens zu jeder Probe gegeben wurden.

5. Nach Laden der Proben lief das Gel für 3-4 Stunden bei 160 Volt (ca. 30mA).

In die äußerste Spur wurden 15 µl des Längenstandards HAE III (PhiX174 RF DNA, Verdünnung 1:20) geladen. Dieser enthält DNA-Stränge bestimmter Längen und ermöglicht dadurch die Größenbestimmung der zu untersuchenden DNA-Fragmente.

6. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel für 20 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben und anschließend auf dem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und photographiert.

Verwendete Geräte und Reagenzien:

Gelapparatur: Vertikal Gel Elektrophoresis
Apparatus; Cat Series 1080
BRL, Life Technologies, Inc, USA

Acrylamid: 40% Acrylamid/Bis-Solution 19:1,
Firma BioRad

TBE-Puffer (10-fach): Tris-Base 108,0 g
Borsäure 55,0 g
EDTA 7,4 g
Gelöst ad 1l dH₂O

Laufpuffer in Gelkammern: 1-fach TBE-Puffer

Längenstandard: PhiX174 RF DNA/HAE III
(1:20 verdünnt) Fragments,
0,5 µg/ml; Firma GIBCO BRL

Gelladepuffer („Blue-Juice“):	Ansatz für 10 ml: 2 ml Bromphenolblau (1%) 0,5 ml Xylenzyanol (1%) 2,0 ml EDTA pH 8,0 (0,5M) 4,0 g Sucrose 0,5 ml SDS (10%) 5 ml H ₂ O
Ammoniumpersulfat (10%):	Kodak Laboratory and Research Products, Eastman Chemical Company
TEMED: (Tetramethylethyldiamin)	Kodak Laboratory and Research Products, Eastman Chemical Company
Ethidiumbromidbad:	Eigene Herstellung: 500 ml TBE-Puffer (1-fach) 5-10 µl Ethidiumbromid (Sigma)
Apparatur zur Erstellung der Polyacrylamidgelbilder:	
Kamera:	Kayser, Germany
Bildschirm:	Hitachi, Cybertech CS 1
Transilluminator:	Biometra
Drucker:	Mitsubishi Videocopy Processor

2.4. Immunhistochemische Färbung für Lasermikrodissektion

Für die vorliegende Arbeit wurden mit Hilfe der Enzym-Immunkomplex-Methode folgende Antigene in Gewebsschnitten lokalisiert:

- das CD3-Antigen, das einen hochspezifischen Marker für T-Zellen darstellt und das auch bei der großen Mehrheit der T-Zell Neoplasien vorkommt.
- das CD4-Antigen, welches in den meisten Fällen kutaner T-Zell-Lymphome exprimiert wird.
- das CD5-Antigen, welches im Rahmen vieler T-Zell-Leukämien und Lymphome exprimiert wird, ebenso wie von aktivierten T-Zellen und von einer B-Zell-Untergruppe.
- das CD7-Antigen, welches vor allem auf T-Zellen wie Natürlichen Killerzellen und Thymozyten sowie im Rahmen von Lymphomen und Leukämien vorkommt.
- und schließlich das CD8-Antigen mit Hilfe dessen zytotoxische Zellen demonstriert werden können.

1. Zunächst wurden 10µm dicke Schnitte auf Superfrost Objektträgern aufgezogen und über Nacht bei 60°C getrocknet.
2. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert wie folgt:
 - 2mal in jeweils frischem Xylol für 10 Minuten
 - 2mal in jeweils frischem 100%igem Ethanol für 10 Minuten
 - in 95%igem Ethanol für 1 Minute
 - in 70%igem Ethanol für 1 Minute
 - 2mal kurz in jeweils frischem, reinsten Aqua dest..
3. Die entparaffinierten Schnitte für die Anfärbung von CD3-, CD4-, CD5- und CD7 wurden in einer EDTA-Lösung von pH 8,0 für 15 Minuten gekocht.

Die Schnitte für die Anfärbung von CD8 wurden in Citratpuffer von pH 6,0 für 10 Minuten gekocht.

4. Nach Spülen in Aqua dest. und anschließend in Tris-HCL-Puffer (pH 7,6), erfolgte die Inkubation der monoklonalen Primär-Antikörper gegen jeweils CD4, CD5, CD7 und CD8 sowie die Inkubation des polyklonalen Primärantikörpers gegen das CD3-Antigen für 25 Minuten. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.
5. Nach erneutem Spülen mit Tris-HCL-Puffer (pH 7,6) wurde der polyklonale Antikörper für CD3 zusätzlich mit dem Mouse-anti-Rabbit-Antikörper für 25 Minuten inkubiert.
6. Erneutes Spülen mit Tris-HCL-Puffer und Inkubation der monoklonalen und polyklonalen Antikörper zusammen mit Brücken-Antikörper Rabbit-anti-Mouse-AK für 25 Minuten.
7. Spülen mit Tris-HCL-Puffer und Inkubation der monoklonalen und polyklonalen Antikörper mit dem APAAP (mouse) - Komplex für 25 Minuten.
8. Vor und nach der sich anschließenden Detektion mit Neufuchsin-Farbstoff für 3 mal 7 Minuten wurde mit Tris-HCL-Puffer gespült.
9. Der Kernfärbung in Hämalaun nach Mayer folgte das Bläuen mit Tris-HCL-Puffer für 1 Minute.
10. Spülen in Aqua dest. reinst für 1 Minute.
11. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe :
 - 2 Minuten in 70% Ethanol

- 2 Minuten in 95% Ethanol
- 2 Minuten in 100% Ethanol
- und abschließend für 2 Minuten in Xylol

12. Die gefärbten Schnitte wurden für 10 Minuten an der Luft getrocknet und schließlich trocken und staubfrei bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Material:

Tabelle 2: Verwendete primäre Antikörper

Name / Klon	Spezifität	Hersteller	Verdünnung
CD3, polyklonal	Hochspezifisch für T-Zellen	Dako ChemMate	1:5
CD4, 1F6	T-Helfer Zellen, Thymozyten, geringer bei Monozyten, CTCL	NovoCastra	1:20
CD5, CD5/54/B4	T-Zellen, B-Zell Untergruppe	NovoCastra	1:50
CD7, CD7-272	T-Zellen (v.a. Nat.Killerzellen, Thymozyten) Lymphome, Leukämien	NovoCastra	1:25
CD8, CD8/144B	Periph. Mononukleäre Zellen, Zytotox./Suppressor Zellen	Dako (ChemMate)	1:25
Sekundär AK (Mouse Anti- Rabbit) MR 12/53	CD3 positive Zellen	Dako	1:100

2.5. Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion oder Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM) basiert darauf, dass visuell ausgewählte Zellen oder Gewebsfragmente eines Gewebeschnittes durch einen Infrarot-Laserstrahl mit einem speziellen Transfer-Film verschmelzen. Anschließend können sie vom Gewebeschnitt abgehoben werden, wobei alle kontaminierenden oder unerwünschten Zellen zurückbleiben. Der transparente Transfer-Film, der als Träger der ausgewählten Zellen dient, sitzt auf einem ebenfalls durchsichtigen Cap. Dieses wird mit Hilfe eines mechanischen Transportarmes auf das gewünschte Areal der Schnittoberfläche gesetzt. Unter dem Mikroskop betrachtet man das Gewebe durch den Film hindurch und wählt die zu untersuchenden Zellen aus.

Mittels Knopfdruck wird eine Laserdiode aktiviert, die Bestandteil der Mikroskop-Optik ist. Ein gepulster Laserstrahl aktiviert präzise die kleine Region des Transfer-Filmes, der sich über den Zellen befindet. Dies führt zu einem fokalen Schmelzen des (EVA)-Films, der sein Absorptionsmaximum nahe der Wellenlänge des Lasers hat.

Je nach Gewebeart und Schnittdicke kann eine geeignete Dauer und Intensität des Laser-Impulses gewählt werden.

Das geschmolzene Polymer dehnt sich in den Gewebsschnitt hinein aus und füllt die winzigen Hohlräume, die im Gewebe vorhanden sind. Innerhalb von Millisekunden verfestigt sich das Polymer wieder und verbindet sich mit dem Gewebe.

Die Laser-Impulse können mehrmals über die gesamte Oberfläche des Caps wiederholt werden, wodurch schnell eine große Zahl selektierter Zellen auf die Membran übertragen und anschließend vom Objektträger abgehoben werden kann.

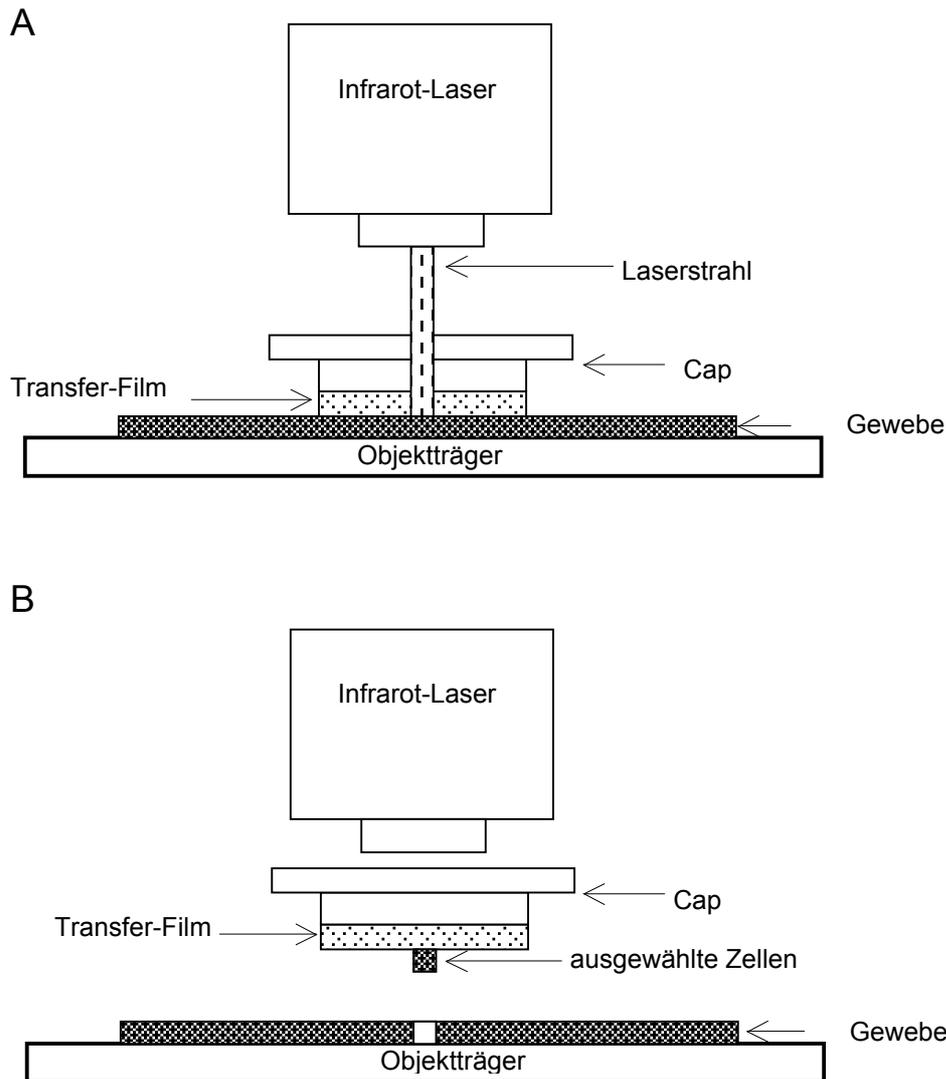


Abb. 7: Der Aufbau des Laser-Mikroskops und schematische Darstellung der Laser-Capture-Mikrodissektion
 A: Aktivierung des Lasers führt zu einem fokalen Schmelzen des Transferfilms
 B: Anheben des Caps löst die Zellen, die mit dem Transferfilm verbunden sind

Die auf diese Weise steril gewonnenen Zellen können unmittelbar einer molekularen Analyse zugeführt werden. Für die Untersuchung wurden pro Biopsie zwischen 30 und 40 Zellen der verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen geerntet. Da das Laser-Mikroskop mit einem PC und einer Digitalkamera verbunden ist, können alle Arbeitsschritte mit den zugehörigen Bildern dokumentiert werden.

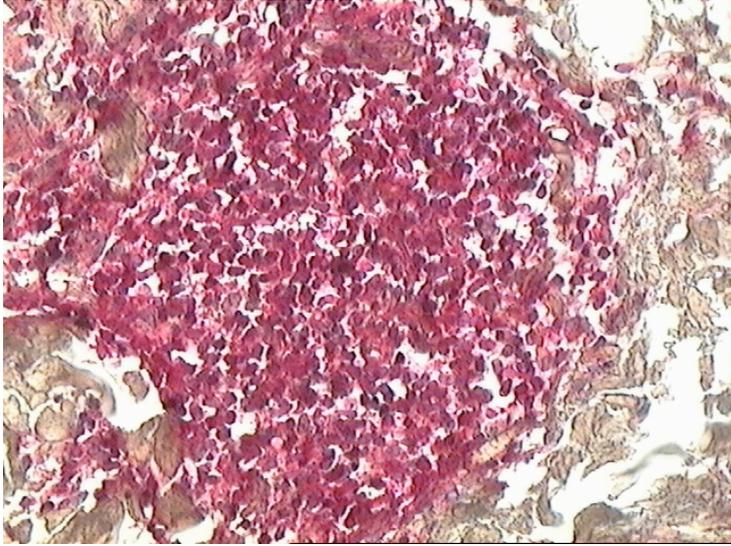


Abb. 8.1

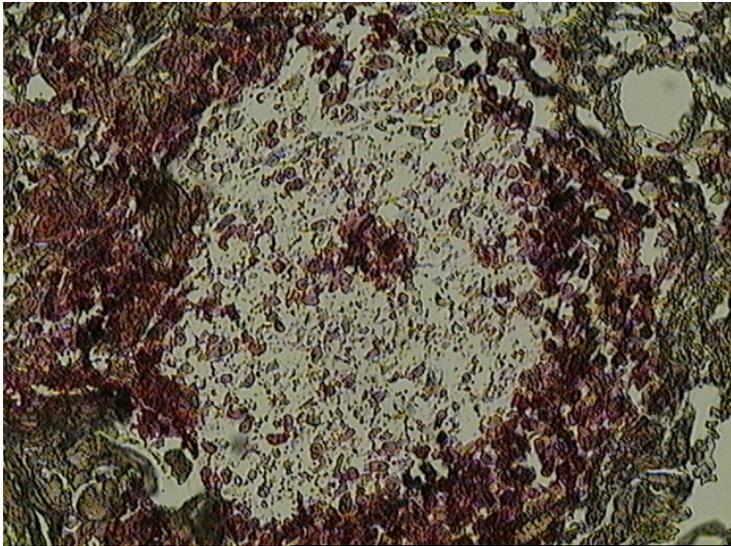


Abb. 8.2

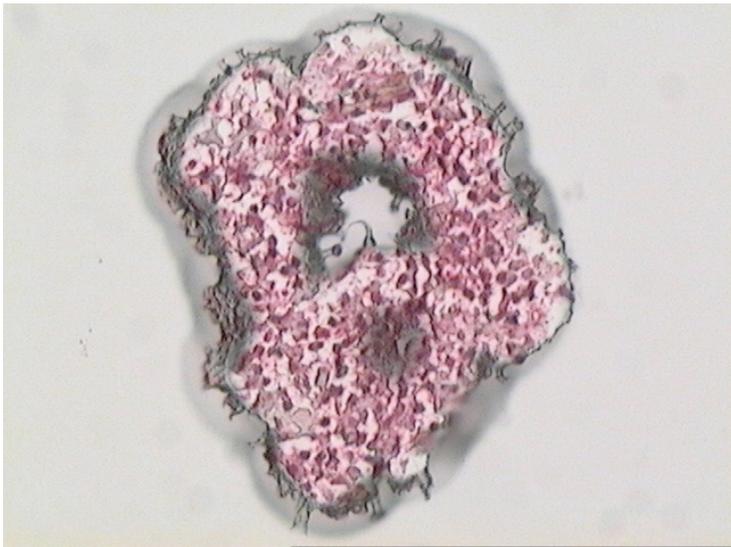


Abb. 8.3

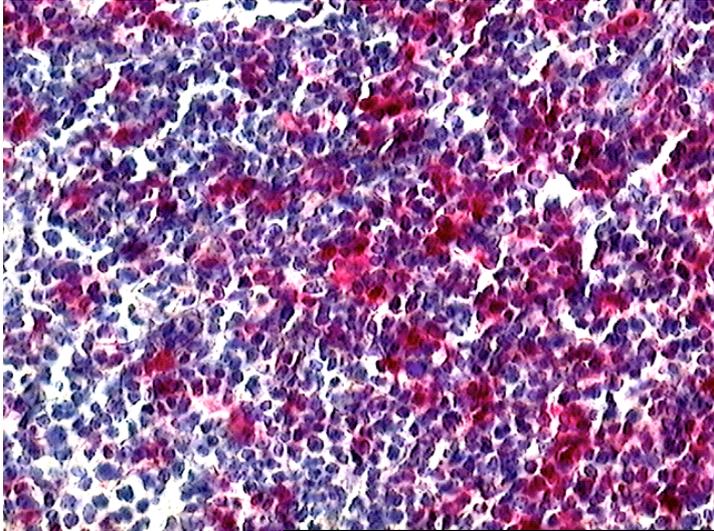


Abb. 9.1

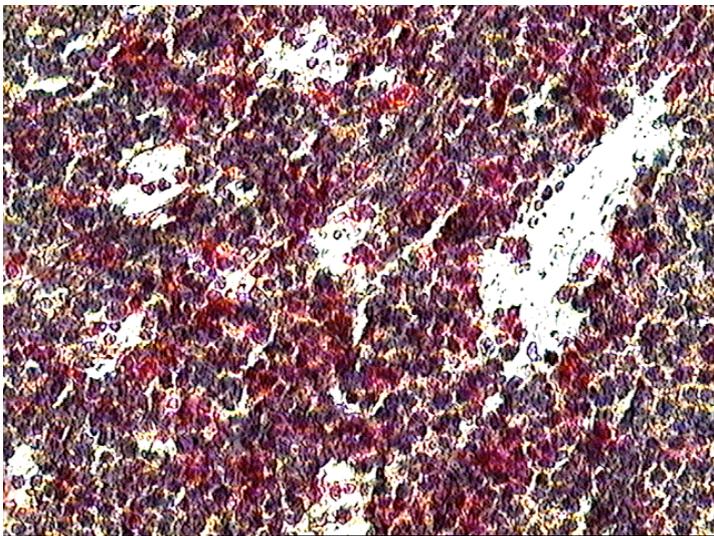


Abb. 9.2

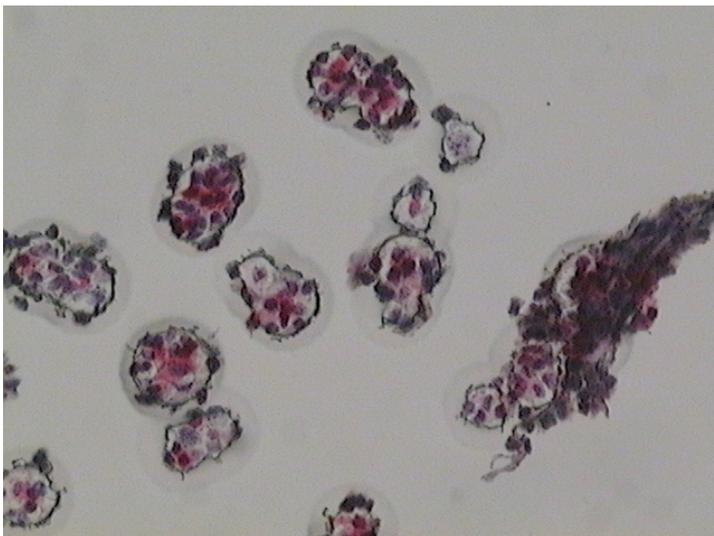


Abb. 9.3

Abb. 8.1 und 9.1: Gewebsschnitt mit deutlicher immunhistochemischer Anfärbung für CD5

Abb. 8.2 und 9.2: Gewebsschnitt nach Bearbeitung mit dem Lasermikrodissektionsmikroskop

Abb. 8.3 und 9.3: durch Lasermikrodissektion gewonnene CD5-positive Zellen

2.6. DNA-Extraktion für Lasermikrodissektion

Die mit Hilfe des Lasers auf die Folie übertragenen Zellen wurden unmittelbar in Tubes überführt und 30 µl Digestionspuffer mit 3 µl Proteinase K zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 50°C. Vor dem Einsatz der Proben in eine PCR wurden die Proben gut gemischt und in neue Tubes überführt, um die Folie zu entfernen. Anschließend wurden die Proben noch für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren.

2.7. β-Globin-Gen PCR und Agarosegelelektrophorese

Um amplifizierbare DNA nachzuweisen, wurde eine PCR zur Detektion eines Abschnittes des β-Globin-Gens durchgeführt.

Die Durchführung der PCR-Reaktionen sowohl für das β-Globin als auch für den T-Zell-Rezeptor unterscheidet sich nur in der Verwendung verschiedener Primer.

1. Für diesen Master-Mix ergaben sich, für ein PCR-Endvolumen von 30µl, folgende Volumina:

Primer: PCO3/KM38 (0,5 µM):	10,0 µl
PCR-Puffer (6,0 mM Mg ²⁺):	15,0 µl
dNTP's (100 µM):	1,2 µl
dH ₂ O:	0,6 µl
AmpliTaq Gold (1,0 U):	0,2 µl

Die in Klammern angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Konzentration im Endvolumen.

Für jedes Probenröhrchen ergab sich ein Volumen von 27 µl.

Für die jeweilige PCR wurden diese Volumina mit der Anzahl der Proben plus einer Reserve multipliziert.

2. Von dem Mix wurden jeweils 27 µl in die vorbereiteten sterilen 0,2 ml Röhrchen pipettiert. Dabei wurde die Pipettenspitze jedesmal gewechselt.
3. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden gut gemischt und zentrifugiert. Jeweils 3 µl wurden zu dem PCR-Ansatz hinzupipettiert, wobei nach jeder der verschiedenen DNA-Proben ein Handschuh- und Pipettenspitzenwechsel durchgeführt wurde.
4. In die Positivkontrollen wurde je 1 µl DNA von Jurkat-Zellen sowie in die Negativkontrollen 1µl dH₂O pipettiert.
5. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und in das entsprechende PCR-Probenrack gestellt.
6. Das PCR-Probenrack wurde in den Thermalcyclus gestellt, dessen Deckelheizung bereits eine Temperatur von 103°C erreicht hatte.
7. Das PCR-Programm des Cyclers beinhaltet folgende Schritte :
 - I. Denaturierung bei 94°C für 7 Minuten und gleichzeitige Präaktivierung des Taq-Enzyms.
 - II. 45 Zyklen der folgenden Reaktion:
 - Denaturierung durch Erhitzen auf 94°C für 30 Sekunden
 - Annealing bei 60°C für 30 Sekunden
 - Extension bei 72°C für 30 Sekunden

- III. Abschließende Extension bei 72°C für 7 Minuten.
- IV. Abkühlung auf 4°C (entsprechend der Lagerungstemperatur bis zur Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese).

Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese:

1. In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,5 g Agarosepulver abgewogen. Nach Hinzufügen von 100 ml 1-fach TBE-Puffer wurde das Gemisch in der Mikrowelle zweimal hintereinander kurz aufgeköcht. Um ein übermäßiges Verdampfen von Flüssigkeit zu verhindern, wurde das Gefäß mit Folie abgedeckt, die mit kleinen Löchern versehen wurde.
2. Die Gelkammer wurde mit den Formkeilen und, je nach Probenanzahl mit dem richtigen Kamm versehen. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde das Gel möglichst blasenfrei gegossen und bis zum völligen Erkalten beiseite gestellt.
3. Währenddessen wurden die PCR-Produkte kurz anzentrifugiert und 3 µl Gelladepuffer (entsprechend 10% der Probe) mit jeweils frischer Pipettenspitze hinzugefügt. Nach gutem Mischen der Proben wurde nochmals kurz anzentrifugiert.
4. Formkeile und Kamm wurden vom erkalteten Gel entfernt und die Kammer mit 800 ml 1-fach TBE-Puffer gefüllt.
5. Anschließend wurde das Gel mit jeweils 15 µl der zu untersuchenden Proben, der Positiv- und Negativkontrollen sowie des Längenstandards geladen. Die Elektrophorese wurde ca. 1 Stunde bei 100 Volt durchgeführt.

6. Nach einem anschließenden Ethidiumbromidbad für 20 Minuten wurde das Gel auf dem Transilluminator photographiert.
7. Das Vorhandensein einer deutlichen Bande in Höhe der Positivkontrolle für das β -Globin-Gen rechtfertigte die Untersuchung der DNA mittels der TCR γ -PCR.

2.8. PCR für Lasermikodissektion und Gelelektrophorese

Arbeitsablauf:

1. Auftauen und Zentrifugieren der benötigten Reagenzien (Primer, dNTP`s, Mg²⁺-Puffer, H₂O für PCR, AmpliTaq-Gold), die dann wieder auf Eis gestellt wurden. Es wurde auf saubere Arbeits- und Stellflächen für die Tubes geachtet.
2. Die sterilen, 0,2 ml PCR-Probenröhrchen wurden mit Handschuhen entnommen und beschriftet, ebenso die Röhrchen für den PCR-Ansatz.
3. Für diesen Master-Mix (30 μ l PCR-Endvolumen) ergaben sich folgende Volumina:

Primer-Mix:	10,0 μ l
PCR-Puffer (3,0 mM Mg ²⁺):	10,0 μ l
dNTP`s (100 μ M):	1,2 μ l
dH ₂ O:	4,6 μ l
AmpliTaQ Gold (1,0 U):	0,2 μ l

Die in Klammern angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die Konzentration im Endvolumen.

Für jedes Probenröhrchen ergab sich ein Volumen von 26 µl. Für die jeweilige PCR wurden diese Volumina mit der Anzahl der Proben plus einer Reserve multipliziert.

4. Von dem Mix wurden jeweils 26 µl in die vorbereiteten Röhrchen pipettiert.
5. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden gut gemischt und zentrifugiert. Jeweils 4 µl wurden zu dem PCR-Ansatz hinzupipettiert, wobei nach jeder der verschiedenen DNA-Proben ein Handschuh- und Pipettenspitzenwechsel durchgeführt wurde.
6. Als Positivkontrollen wurden je 1 µl der DNA der malignen T-Zell-Reihen Jurkat und HSB2 sowie für die Negativkontrollen je 1 µl dH₂O pipettiert.
7. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und in den entsprechenden PCR-Probenhalter gestellt.
8. Der PCR-Probenhalter wurde in den Thermalcycler gestellt, dessen Deckelheizung bereits eine Temperatur von 103°C erreicht hatte.
9. Das PCR-Programm des Cyclers beinhaltet folgende Schritte :
 - I. Denaturierung bei 94°C für 7 Minuten
 - II. 45 Zyklen der folgenden Reaktion:
 - Denaturierung durch Erhitzen auf 94°C für 30 Sekunden
 - Annealing bei 60°C für 30 Sekunden
 - Extension bei 72°C für 30 Sekunden
 - III. Abschließende Extension bei 72°C für 7 Minuten.
 - IV. Abkühlung auf 4°C (entsprechend der Lagerungstemperatur bis zur Durchführung der Gelelektrophorese).

Verwendete Geräte und Reagenzien:

PCR-Thermal-Cycler:	Firma Applied Biosystems GenAmp 9700 mit Deckelheizung
PCR-Tubes (0,2 ml):	Firma PeqLab, ThermoTubes
AmpliTaq-Gold:	Applied Biosystems Stammlösung 5 U/ μ l
dNTP`s:	Firma Perkin Elmer Stammlösung 10 mM
PCR-Puffer für 10 μ l: (β -Globulin-Gen PCR)	3 μ l 10-fach PCR-Puffer (150 mM TRIS-HCl pH 8,0 500 mM KCl) 3,6 μ l Mg ²⁺ (Stammlösung 25 mM) 3,4 μ l dH ₂ O
PCR-Puffer für 15 μ l: (PCR für LCM)	3 μ l 10-fach PCR-Puffer (150 mM TRIS-HCl pH 8,0 500 mM KCl) 7,2 μ l Mg ²⁺ (Stammlösung 25 mM) 4,8 μ l dH ₂ O
PCR-Wasser:	InVitrogen
Positivkontrolle Jurkat:	für V γ 2 und V γ 11

Positivkontrolle HSB2:	für V γ 9 und V γ 10
Primer für β -Globulin-Gen PCR:	Firma MWG-Biotech, Ebersberg, 169 bp
Primer für T-Zell Rezeptor-PCR:	Firma MWG-Biotech, Ebersberg

Durchführung der Gelelektrophorese:

Arbeitsablauf identisch zu S. 35-37

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung (TCR γ -PCR) aus Paraffingewebe

Die Amplifikation mit spezifischen Primern für die γ -Kette des T-Zell-Rezeptorgens führt zu einer hohen Zahl an Genfragmenten mit identischer Größe und Sequenz. Ist deren Zahl ausreichend hoch, bilden sie, nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid, durch Anregung im ultraviolettem Bereich (312 nm) eine sichtbare Bande. Heterogene Fragmente dagegen, wie sie durch Amplifikation der DNA von polyklonalen Zellen entstehen, bilden ein diffuses Bandenmuster.

Tabelle 3: Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung aus Paraffingewebe

Pat. Nr.	klonales Rearrangement	Diagnose
1	V γ 2, V γ 11	MF
2	V γ 2	MF
3	V γ 11	MF
4	V γ 11	Dermatitis
5	V γ 11	MF
6	V γ 10	MF
7	V γ 2	MF
8	V γ 2, V γ 10	MF
9	V γ 2, V γ 9	atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat
10	V γ 2, V γ 11	MF
11	V γ 9	MF
12	V γ 2, V γ 9	MF
13	V γ 10	MF
14	V γ 2, V γ 11	MF
15	kein klonales Rearr.	
16	kein klonales Rearr.	atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat

Von den 16 untersuchten Biopsien wurde zweimal ein Rearrangement für V γ 2 und einmal für V γ 9 gefunden. Ein Rearrangement für V γ 10 wurde zweimal, für V γ 11 dreimal eindeutig festgestellt. Die Kombination von V γ 2 und V γ 9 kam zweimal, die Kombination V γ 2 und V γ 10 einmal vor. Dreimal konnte ein Rearrangement für V γ 2 und gleichzeitig für V γ 11 festgestellt werden. Ein Fall zeigte trotz klinischer Diagnose MF kein Rearrangement und auch der Referenzfall zeigte in dieser Untersuchung keine Klonalität. Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurde die Lasermikrodissektion durchgeführt.

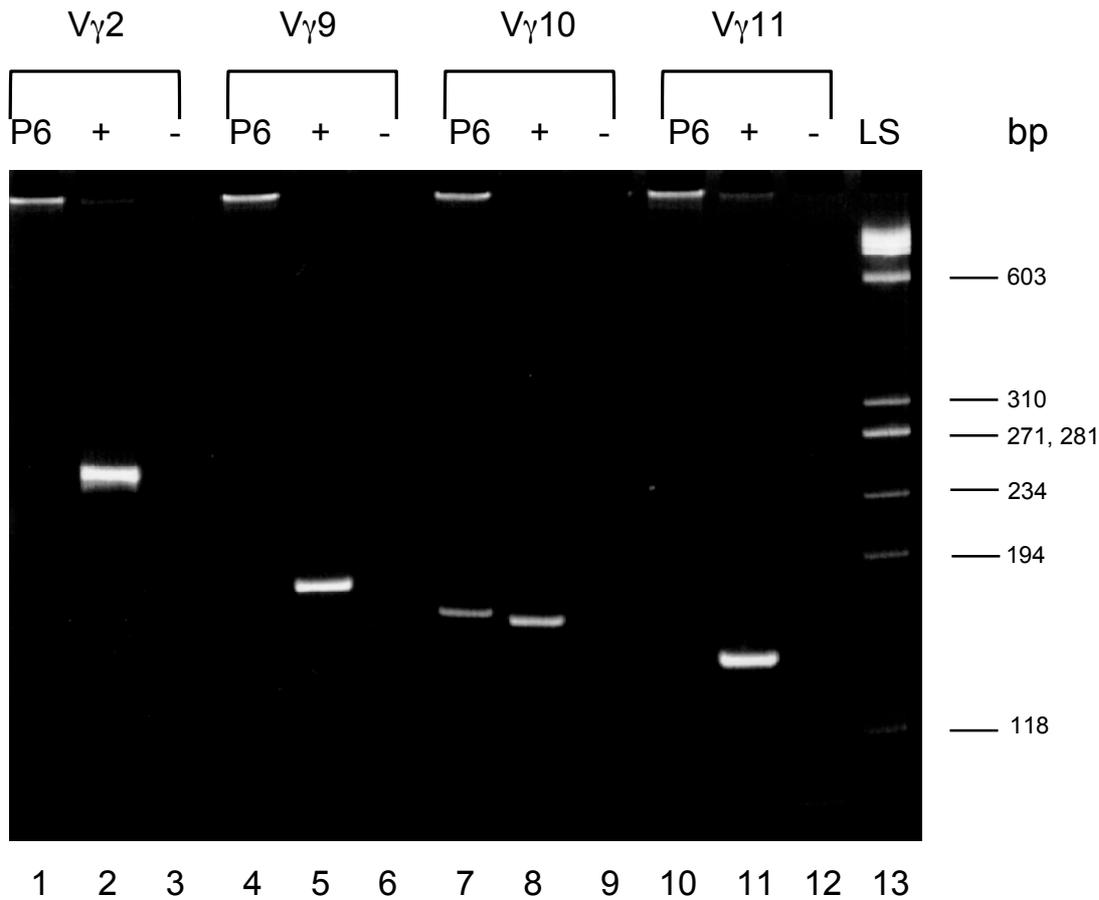


Abb.10: Photographie des Polyacrylamidgels nach Elektrophorese, Patient Nr.6 (=P6) mit Rearrangement für V γ 10.

Spur 7 zeigt eine positive Bande, Spur 8 beinhaltet die Positivkontrolle für V γ 10, die Spuren 3, 6, 9 und 12 entsprechen den Negativkontrollen und Spur 13 dem Längenstandard (LS) mit Angabe der Anzahl an Basenpaaren (bp). Die Spuren 2, 5 und 11 sind Positivkontrollen für V γ 2, V γ 9 und V γ 10 ohne Nachweis positiver Banden auf den Spuren 1, 4 und 10.

3.2. Ergebnisse der Lasermikrodissektion

Von nahezu allen Patienten konnten Lymphozyten der einzelnen Subpopulationen mittels LCM gewonnen werden. Die Zellen wurden nur dann in einer TCR γ -PCR weiterverarbeitet, wenn es gelang, eine ausreichende Menge DNA durch Amplifikation eines Fragments des β -Globin-Gens nachzuweisen.

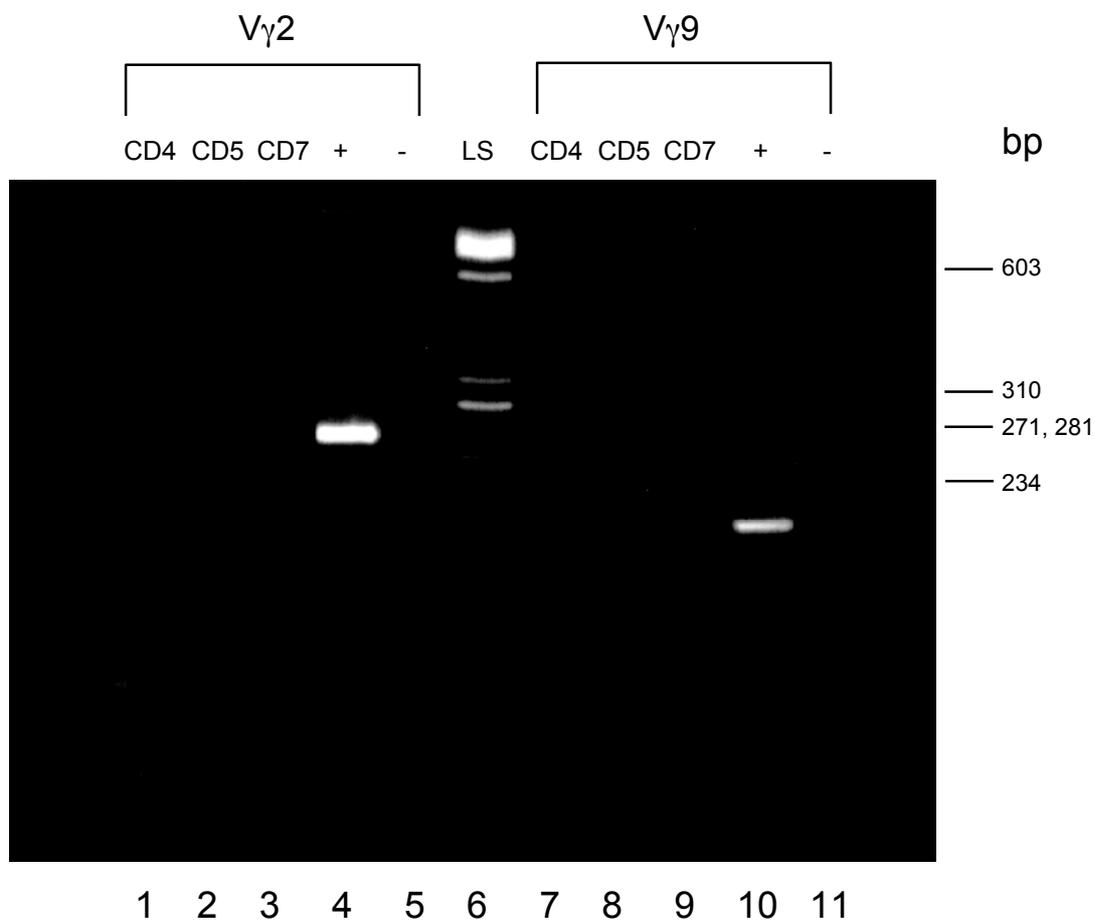


Abb. 11: CD4, CD5, und CD7 positive Zellen von Patient Nr. 6, V γ 2- und V γ 9-PCR.

Spur 4 und 10 stellen Positivkontrollen für V γ 2 und V γ 9 dar.

Auf den Spuren 1 und 7 (CD4), 2 und 8 (CD5) sowie 3 und 9 (CD7) kommen keine Banden zur Darstellung. Spur 6 entspricht dem Längenstandard, Spur 5 und 11 sind Negativkontrollen.

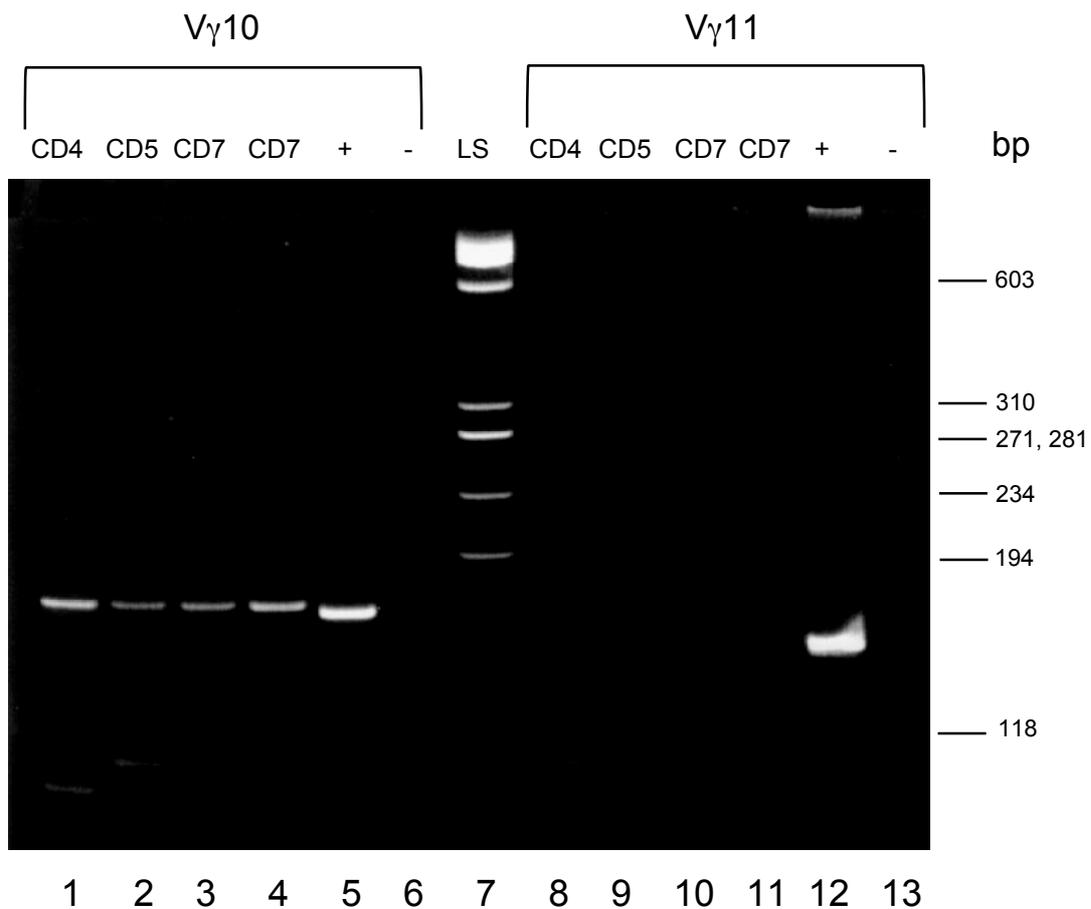


Abb. 12: CD4, CD5 und CD7 positive Zellen von Patient Nr. 6, V γ 10- und V γ 11-PCR.

Spur 1(CD4), Spur 2 (CD5) sowie die Spuren 3 und 4 (CD7) zeigen positive Banden. Spur 5 ist die Positivkontrolle für V γ 10. Spur 8 (CD4), Spur 9 (CD5) und Spur 10 und 11 (CD7) bleiben ohne positiven Bandennachweis, Spur 12 stellt die Positivkontrolle für V γ 11 dar.

V γ 9

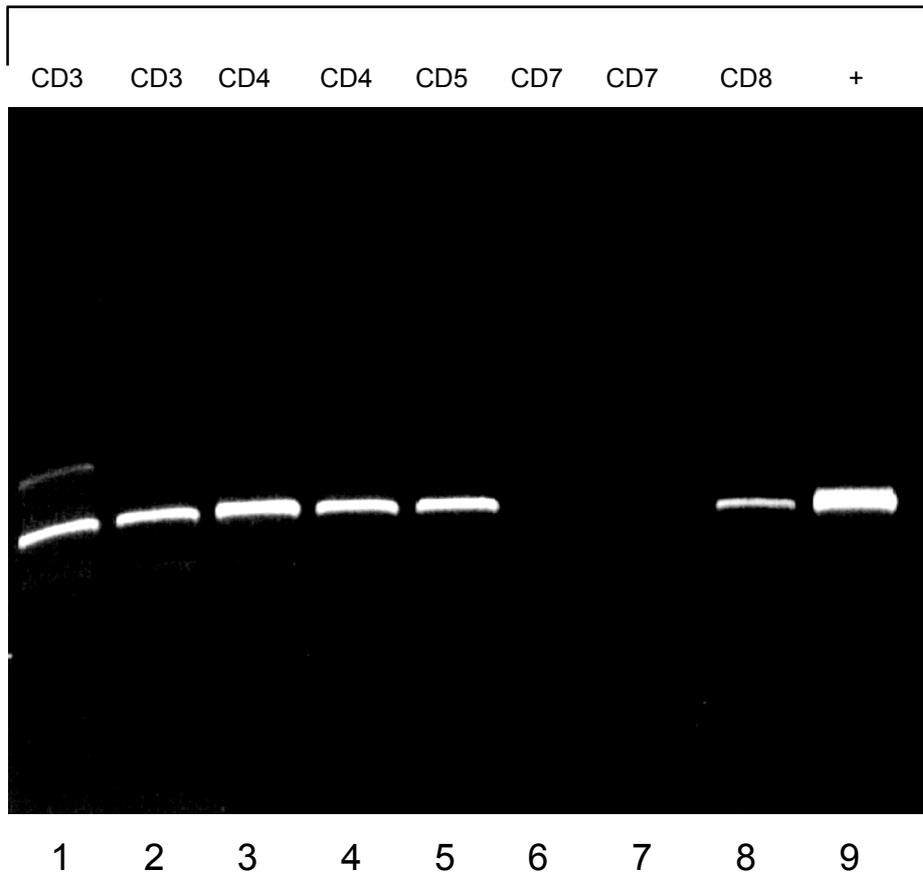


Abb. 13: Ausschnittsvergrößerung der Gelelektrophorese am Polyacrylamidgel mit V γ 9-PCR, CD3-, CD4-, CD5-, CD7- und CD8 positive Zellen, Patient Nr. 5, Fall 2b.

Die Spuren 1 und 2 (CD3), Spuren 3 und 4 (CD4) sowie Spur 5 (CD5) und Spur 8 sind positiv. Spur 7 (CD7) bleibt negativ. Die Spur 9 ist die Positivkontrolle für V γ 9.

Lediglich in zwei Fällen konnten keine CD8+, beziehungsweise CD3+ und CD8+ Zellen gewonnen werden, da sich nach immunhistochemischer Färbung zu wenige Zellen darstellten oder kein DNA-Nachweis gelang.

Der besseren Übersichtlichkeit wegen, wurden die Ergebnisse der TCR γ -PCR in sechs Gruppen eingeteilt. Tabelle 4 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 4: Ergebnisse der Klonalitätsuntersuchung nach Lasermikrodissektion von immunhistologisch gefärbten Lymphozytenpopulationen

Gruppe 1:

Fall Nr. 1a Pat. Nr. 1 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2				X	X	
	V γ 9						
	V γ 10						
	V γ 11		X	X			X
Fall Nr. 1b Pat. Nr. 2 Diagnose MF Paraffin Vy2		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9			X		X	
	V γ 10						
	V γ 11		X	X	X	X	
Fall Nr. 1c Pat. Nr. 3 Diagnose MF Paraffin Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9		X	X			
	V γ 10						
	V γ 11		X	X	X	X	

Gruppe 2:

Fall Nr. 2a Pat. Nr. 4 Diagnose MF Paraffin Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9		X		X		
	V γ 10					X	
	V γ 11		X	X	X	X	X
Fall Nr. 2b Pat. Nr. 5 Diagnose MF Paraffin Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9		X	X	X		X
	V γ 10						
	V γ 11		X	X	X	X	X
Fall Nr. 2c Pat. Nr. 6 Diagnose MF Paraffin Vy10		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9						
	V γ 10		X	X	X	X	X
	V γ 11						

Gruppe 3:

Fall Nr. 3a Pat. Nr. 7 Diagnose MF Paraffin Vy2		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2			X	X		X
	V γ 9			X			
	V γ 10						
	V γ 11		X				X
Fall Nr. 3b Pat. Nr. 8 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy10		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2			X			X
	V γ 9						
	V γ 10			X			
	V γ 11			X	X		
Fall Nr. 3c Pat. Nr. 9 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy9		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2			X			
	V γ 9						X
	V γ 10						
	V γ 11						

Gruppe 4:

Fall Nr. 4a Pat. Nr. 10 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9						
	V γ 10				X		
	V γ 11				X		X
Fall Nr. 4b Pat. Nr. 11 Diagnose MF Paraffin Vy9		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2				X		
	V γ 9				X		X
	V γ 10						
	V γ 11						

Gruppe 5:

Fall Nr. 5a Pat. Nr. 12 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy9		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2					X	
	V γ 9		X		X	X	
	V γ 10			X			
	V γ 11						
Fall Nr. 5b Pat. Nr. 13 Diagnose MF Paraffin Vy10		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2						n.d.
	V γ 9			X		X	n.d.
	V γ 10				X		n.d.
	V γ 11					X	n.d.
Fall Nr. 5c Pat. Nr. 14 Diagnose MF Paraffin Vy2, Vy11		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
	Genabschnitt						
	V γ 2		n.d.	X			n.d.
	V γ 9		n.d.		X	X	n.d.
	V γ 10		n.d.				n.d.
	V γ 11		n.d.	X			n.d.

Gruppe 6:

Fall Nr. 6a		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
Pat. Nr. 15	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9						
	Diagnose	V γ 10					
	MF	V γ 11		X			
	Paraffin	Keine Klonalität					
Fall Nr. 6b		Antigen	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8
Pat. Nr. 16	Genabschnitt						
	V γ 2						
	V γ 9						
	Diagnose	V γ 10					
	Referenzfall	V γ 11	X		X	X	
	Paraffin	Keine Klonalität					

Legende zu Tabelle 4:

Pat. Nr. bezieht sich auf Tabelle 3.

„Paraffin“ bedeutet Ergebnis des TCR- γ -Rearrangements im Standardverfahren.

„X“ bedeutet Nachweis eines Rearrangements auf einem bestimmten Genabschnitt der jeweils angegebenen Lymphozytensubpopulation.

n.d. bedeutet dass sich in dieser Hautbiopsie immunhistochemisch keine Zellen mit der entsprechenden Eigenschaft nachweisen ließen und daher auch nicht mittels Lasermikrodissektion auf Klonalität untersucht werden konnten.

Die Ergebnisse wurden in sechs Gruppen zusammengefasst.

Gruppe 1 umfasst die Biopsien dreier Patienten mit einem TCR-Rearrangement in $V\gamma 2$ kombiniert mit $V\gamma 11$ beziehungsweise nur $V\gamma 2$ oder $V\gamma 11$. In diesen Fällen wurden Klone in allen Lymphozytensubpopulationen bis auf die CD8-positive Lymphozytensubpopulation gefunden.

In einem Fall wurde das Rearrangement nicht auf dem zu erwartenden Genabschnitt $V\gamma 2$, sondern auf $V\gamma 9$ und $V\gamma 11$ gefunden. Die anderen Ergebnisse spiegeln das bereits vorliegende PCR-Ergebnis wieder.

Gruppe 2 wird gebildet von drei Biopsien mit Rearrangements in $V\gamma 11$ (zweimal) und $V\gamma 10$ (einmal). In allen Fällen konnte Klonalität in diesen Genabschnitten bei allen untersuchten Lymphozytensubpopulationen aufgedeckt werden. In zwei Fällen lag klinisch das Tumorstadium der Erkrankung vor.

In Fall 2a und 2b wurden zusätzliche Klone im Abschnitt $V\gamma 9$ entdeckt.

Gruppe 3 besteht aus den Hautproben dreier Patienten, die in der Standarduntersuchung Klonalität in $V\gamma 2$, $V\gamma 2$ und $V\gamma 9$ beziehungsweise $V\gamma 2$ und $V\gamma 10$ aufwiesen.

Es fiel auf, dass sich Klonalität in diesen Genabschnitten sowohl bei der CD4+ als auch der CD8+ Subpopulation befand, während die CD7+ Zellen kein Rearrangement zeigten.

Gruppe 4 umfasst zwei Fälle (Rearrangement $V\gamma 2$ und $V\gamma 11$ beziehungsweise $V\gamma 9$), die auf den entsprechenden Genabschnitten Klonalität aufwiesen, jedoch nur in der CD5+ und CD8+ Subpopulation. Auch hier wurden zusätzliche Klone auf anderen Genabschnitten als in der Standarduntersuchung entdeckt.

In **Gruppe 5** wurden drei Biopsien von Patienten zusammengefasst die sich, trotz eindeutigen Vorliegens eines monoklonalen Infiltrates in der Standarduntersuchung, in der Analyse nach Lasermikrodissektion oligoklonal darstellten. Auch hier wurden, wie schon in Gruppe 1 und 2 zusätzliche Klone im Abschnitt $V\gamma 9$ gefunden. In Fall 5a wurde ein weiterer Klon im Genabschnitt $V\gamma 10$ beziehungsweise in Fall 5b ein Klon im Abschnitt $V\gamma 11$ entdeckt, jeweils ohne entsprechendes Ergebnis in der Untersuchung des Paraffingewebes.

Gruppe 6 wird gebildet von einem Patienten, der in der Standarduntersuchung kein Rearrangement aufwies. Die Untersuchung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen ergab Klonalität der $CD4+$ Lymphozyten im Abschnitt $V\gamma 11$. Die Biopsie des zweiten Patienten, die als Referenzfall diente, wurde in dem dermatohistopathologischen Gutachten als atypisches lymphohistiozytäres Infiltrat eingeschätzt. Die Klonalitätsanalyse aus dem Gesamtpräparat ergab keinen Hinweis auf ein monoklonales Infiltrat. Als wir die gleiche Untersuchung an den mittels LCM selektieren Lymphozyten durchführten, zeigte sich ein für den Abschnitt $V\gamma 11$ monoklonales Infiltrat in den für $CD3$, $CD5$ und $CD7$ positiven Zellen.

4. Diskussion

T-Zell-Lymphome leiten sich von T-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien ab.

Mit den diagnostischen Möglichkeiten der Immunzytologie, Zytogenetik und Molekularbiologie lassen sich die neoplastischen Zellen näher charakterisieren. Dies hatte die Einführung neuer Lymphomentitäten in der REAL- und WHO-Klassifikation zur Folge.

Die Mycosis fungoides ist das häufigste primär kutane T-Zell-Lymphom, in dessen Verlauf es zu sekundärem Lymphknotenbefall kommen kann.

Im weiteren Krankheitsverlauf können Organinfiltrationen beispielsweise an der Leber auftreten.

Morphologisch zeigen sich atypische Lymphozyten mit irregulären, zerebriformen Nuklei. Diagnostisch wertvoll, wenn auch nicht allein beweisend, ist der Nachweis eines TCR-Gen-Rearrangements.

Der typische Immunphänotyp der Mycosis fungoides ist durch Pan-T-Zellmarker, mit ca. 80% CD4-positiven Zellen und des weiteren durch CD5-positiven Zellen gekennzeichnet. Das Fehlen von CD7-positiven Zellen ist typisch in allen Stadien der MF (32).

Auch namhafte Forscher auf dem Gebiet der kutanen Lymphome wie Bruce Smoller betonen, dass die MF eine CD4-positive T-Zell- Erkrankung sei (persönliche Mitteilung).

Im Klonalitätsnachweis mittels PCR wurden dünne Schnitte von der gesamten Hautbiopsie hergestellt und die, mit Hilfe der Lasermikrodissektion gewonnene DNA von Einzelzellen im Vergleich untersucht.

Das erste Hauptaugenmerk unserer Untersuchung richtete sich nun darauf zu analysieren, ob sich die Resultate der Standarduntersuchung in den Ergebnissen der Lasermikrodissektion widerspiegeln. In 7 von 16 untersuchten Fällen (43,75%) (Fall 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 4b und 5b) wurde in der konventionellen Standarduntersuchung, im Rahmen derer DNA vom

Paraffinblock untersucht wurde, nur ein einzelnes klonales Rearrangement aufgedeckt, während die Untersuchung der, durch Mikrodissektion gewonnenen Einzelzellen weitere klonale Rearrangements detektierte.

Dieses Ergebnis steht im Einklang zur Untersuchung von Vega et al (43), in der eine klonale Heterogenität bei MF gezeigt werden konnte.

Vega et al, die ihre Untersuchung im Unterschied zu uns nicht mittels Lasermikrodissektion sondern mit Hilfe einer 4-farbigen TCR- γ -PCR und GeneScan-Analyse durchführten, fanden bei einem Drittel der untersuchten Patienten, die in mindestens 2 Hautbiopsien ein identisches klonales Genrearrangement aufwiesen, andere zusätzliche klonale Genrearrangements.

Desweiteren fügen sich unsere Ergebnisse gut ein in die Theorie von Burg et al. (9). Diese geht davon aus, dass präneoplastische, reaktiv-entzündliche Veränderungen, welche der, zu Beginn der Erkrankung von MF-Patienten häufig beschriebenen chronischen Dermatitis entsprechen, sich in mehreren Schritten zu Neoplasien mit reproduzierbaren, klinisch-pathologischen Malignitätskriterien entwickeln.

Während der Entwicklung von einer normalen zu einer neoplastischen Zelle, scheinen die Lymphozyten von einem Antigen unklarer Herkunft, beispielsweise einem bakteriellen Protein zu reaktiver Zell-Proliferation angeregt zu werden. Diese reaktiven Lymphozyten entwickeln schließlich eine zunehmende genetische Instabilität.

Wie in jeder Zelle, steigt mit der Anzahl der Zellteilungen das Risiko für Mutationen, welches jedoch in normalen Zellen durch Mechanismen wie den programmierten Zelltod limitiert ist. In Cutanen T-Zell-Lymphomen wird Apoptose jedoch durch vermehrte Expression des BCL-2 Proteins verhindert (13).

Burg et al (9) zeigten, dass in einem reaktiven Infiltrat (Pseudolymphom), ein oligoklonales Bild vorherrschend ist. Nach vielen Jahren Antigenstimulation kommt es möglicherweise zu einer unabhängigen Zunahme von mehreren Klonen an unterschiedlichen Stellen. Erst wenn im Laufe der Entwicklung

zum kutanen T-Zell Lymphom ein Zellklon dominant wird, resultiert daraus schließlich molekularmorphologisch ein monoklonales Bild.

Übertragen auf unsere Untersuchung bedeutet dies, dass die sehr sensitive Darstellung von klonalen Rearrangements mit Hilfe der LCM Rückschlüsse auf das (molekularbiologische) Stadium einer Erkrankung zulässt. So fällt auf, dass in den beiden Fällen (Patient 2b und 2c) mit ausgesprochen fortgeschrittener MF (Tumorstadium) ein monoklonales Bild in allen untersuchten Zellen vorlag. In früheren Stadien (beispielsweise Patient 5b), konnte dagegen ein oligoklonales Bild gefunden werden.

Vega et al (43) konnten zeigen, dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, unabhängig vom klinischen Stadium der Erkrankung, in mehreren Hautbiopsien dasselbe Genrearrangement aufwiesen, ein höheres Risiko hatten, eine fortschreitende Erkrankung zu entwickeln.

Der Nachweis eines klonalen Genrarrangements durch PCR-Analyse einer einzigen Läsion sei, vor allem bei Patienten in frühen Krankheitsstadien nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines dominanten oder systemisch disseminierten Klons zu ziehen.

Die Identifikation neoplastischer Zellen ist in frühen Läsionen der MF vor allem deshalb schwierig, weil das Infiltrat diskret ist und reaktive T-Lymphozyten zusammen mit neoplastischen vorkommen. Die Untersuchung des TCR-Gen-Rearrangements zeigt zu diesem Zeitpunkt nur in etwas mehr als der Hälfte der Fälle Monoklonalität (5).

Cerroni et al (10) sowie unsere Arbeitsgruppe Yazdi et al (53) konnten zeigen, dass die PCR-Analyse früher MF-Läsionen durch die Methode der Mikrodissektion sensitiver wird. Insgesamt wurden in der Arbeit von Cerroni Hautläsionen von fünf Patienten im Frühstadium einer MF untersucht. Durch Mikrodissektion der Epidermis gelang der Nachweis monoklonaler T-Lymphozyten-Populationen in vier Fällen, während im Gesamtpräparat nur in zwei Fällen Monoklonalität bestätigt werden konnte. Dies ist sowohl durch das Vorhandensein vieler reaktiver Lymphozyten im Infiltrat als auch, wie bereits erwähnt durch Verdünnung der spezifischen DNA durch DNA aus

anderen Zellen, wie zum Beispiel in der Haut Keratinozyten und Schweißdrüsen, zu erklären.

Bei unserem Patient 6a handelt es sich klinisch ebenfalls um eine Frühform der MF (Patchstadium), die in der Standarduntersuchung kein Rearrangement aufwies. Die Untersuchung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen ergab jedoch Klonalität der CD4+ Lymphozyten im Abschnitt V γ 11.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sich hier höchstwahrscheinlich um die Frühform einer MF handelt. Es ist vorstellbar, dass die Entwicklung eines Klons in diesem Fall ihren Ausgang von den CD4+ Lymphozyten nimmt. Auf den klinischen Alltag übertragen bedeutet dies, dass der Patient engmaschig kontrolliert werden sollte, indem verschiedene Läsionen molekularbiologisch untersucht werden.

Für die Entstehung klonaler Heterogenität existieren noch weitere Theorien.

Bisher konnte das Vorhandensein von zwei klonalen Sequenzen (beispielsweise V γ 2, V γ 10) nicht auf zwei unterschiedliche Tumorzellpopulationen (biklonal) respektive auf zwei Allele desselben Klons (biallelisch) zurückgeführt werden.

Es ist denkbar, dass es in unserer Routineuntersuchung, aufgrund unterschiedlicher Effektivität der PCR in den beiden Allelen, zu einer asymmetrischen Amplifikation kommt. Die Folge ist, dass nur ein Allel die Möglichkeit hat amplifiziert zu werden. Wird nun die Untersuchung an den Lymphozytensubpopulationen ohne das störende Genmaterial polyklonaler oder reaktiver Zellen durchgeführt, können beide Allele in einer Menge amplifiziert werden, die ausreicht, um sie durch Gelelektrophorese zu detektieren. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen waren auch Gellrich et al (16) gekommen, die Einzelzellen auf ihr klonales Rearrangement hin untersuchten, sequenzierten und ein identisches, biallelisches Rearrangement fanden.

Eine weitere, wenn auch weniger wahrscheinliche Erklärung für klonale Heterogenität wäre die Entwicklung von Subklonen aus dem dominanten T-

Zell-Klon durch fortlaufende Rearrangements oder Deletionen am TCR-Genort.

Ein weiteres Hauptaugenmerk richtete sich auf die Frage, ob die klonale Entwicklung auf eine bestimmte Lymphozytensubpopulation und damit unter Umständen auf ein bestimmtes Stadium der Lymphozytenentwicklung zurückzuführen sei.

In 5 von 16 Fällen (31,25%) (2a, 2b, 2c, 3a und 3b) konnten wir das monoklonale Rearrangement sowohl in den CD4 als auch den CD8-positiven Zellen lokalisieren.

Dies erscheint umso erstaunlicher, als man weiß, dass reife T-Lymphozyten als T-Helfer-Zellen entweder CD4 (zu 2/3) oder als zytotoxische T-Zellen CD8 (zu 1/3) exprimieren, jedoch nie CD4 und CD8 gleichzeitig (siehe dazu Kapitel 1.3.).

Immunhistochemische Untersuchungen beschrieben das Infiltrat der MF als bestehend aus CD4-positiven und CD8-negativen, reifen T-Zellen (45). Diese Beschreibung kann jedoch nicht gleichbedeutend damit sein, dass der Ursprung der malignen Entwicklung in der T-Helfer-Zellreihe liegt. Vielmehr deutet ein monoklonales Rearrangement in beiden T-Zell-Subpopulationen darauf hin, dass die maligne Entwicklung ihren Ausgangspunkt von einem Stadium der T-Zell-Entwicklung nehmen könnte, in dem die Thymozyten noch doppelt negativ sind oder CD4 und CD8 koexprimieren.

Eine andere Erklärung wäre, dass es sich um zwei unterschiedliche Rearrangements des gleichen Genabschnitts (beispielsweise V γ 11) handelt. Um dies zu prüfen, müssten die Gene der Lymphozytensubpopulationen für die γ -Kette des TCRs sequenziert werden.

Diese Erklärung ist von Bedeutung wenn man beachtet, dass insgesamt in einer ebenso hohen Anzahl von Fällen ein Klonalitätsnachweis lediglich für CD4 ohne CD8 (Fall 1a, 1b und 1c) beziehungsweise für CD8 ohne CD4 (Fall 4a und 4b) gelang.

Der Referenzfall 6b zeigt ein häufiges Problem der Klonalitätsbestimmung auf.

Die Hautbiopsie des Patienten ist auf der Basis des dermatohistopathologischen Gutachtens vereinbar mit einem atypischen lymphohistiozytären Infiltrat (Pseudolymphom).

Die konventionelle Klonalitätsuntersuchung ergab keinen Hinweis auf ein monoklonales Infiltrat. Doch in der Klonalitätsuntersuchung mittels LCM wurde ein, im Bezug auf den Genabschnitt V γ 11, monoklonales Infiltrat in den CD3, CD5 und CD7-positiven Zellen erkennbar. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass die Demonstration einer monoklonalen T-Zell Population per se nicht gleichgesetzt werden darf mit der Diagnose eines kutanen T-Zell Lymphoms. Eine monoklonale Population kann beispielsweise das Resultat einer lokalen Expansion stimulierter Zellen sein oder im Rahmen MF-ähnlicher Erkrankungen wie kutanes Pseudolymphom oder Parapsoriasis en plaque auftreten. Schiller et al (36) konnten Klonalität beim Lichen planus, einer entzündlichen Hauterkrankung nachweisen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Anzahl der klonalen, malignen T-Zellen in einer Biopsie unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegt. Daher ist die Korrelation mit Pathologie und Klinik absolut erforderlich.

Ein weiterer Anlass zur Diskussion ergibt sich für die Darstellung von Klonalität bezüglich des Genabschnittes V γ 9.

In 6 von insgesamt 16 Fällen (37,5%) (Fall 1b, 2a, 2b, 3a, 5b und 5c) wurden durch die LCM ein monoklonales Rearrangement des Genabschnittes V γ 9 aufgedeckt, für welches es in der Routineuntersuchung kein Korrelat gab. Dies kann, wie bereits zu Beginn dargelegt, auf die höhere Sensitivität der PCR mit DNA von selektierten Lymphozyten zurückgeführt werden. Allerdings ergibt sich für den Genabschnitt V γ 9 eine besondere Situation:

Die Amplifikation mit Hilfe des V γ 9-Primers führt häufiger zu Banden mit niedriger Intensität. Da die Anzahl der möglichen TCR-Gen-Rearrangements des V γ 9 Segments sehr viel geringer ist als beispielsweise die der V γ 1-8

Segmente, kommt es statistisch häufiger zu zufällig identischen Rearrangements. Als Folge wäre denkbar, dass ein TCR-Gen-Rearrangement, ist es auch nur in wenigen Kopien vorhanden, amplifiziert wird und schließlich eine sichtbare Bande auf dem Gel bildet (50).

Um ein pseudoklonales Bild zu verhindern und ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurden 30-40 Zellen mittels Laser-Mikrodissektion gewonnen und molekularbiologisch untersucht.

Anhand unserer Untersuchungsergebnisse (beispielsweise Fall 3a und 3b) stellten wir uns die Frage, wie es möglich ist, dass CD4-positive Zellen Klonalität aufwiesen und CD3-positive Zellen nicht, obwohl diese Marker gleichzeitig exprimiert werden.

Dafür gibt es eine mögliche Erklärung: Der Pan T-Zell Marker CD3 ist auf beinahe allen reifen T-Lymphozyten vorhanden, während das CD4- Antigen nur auf einem Teil der CD3-positiven Lymphozyten vorkommt. Angenommen die CD4/CD3-positiven Zellen zeigen ein monoklonales Rearrangement: Werden nun mit Hilfe der LCM in erster Linie CD3-positive Zellen untersucht, so befinden sich unter ihnen zwar auch CD4/CD3-positive Zellen, jedoch in deutlich niedrigerer Zahl. Das klonale Rearrangement kann in diesem Fall in so wenigen Zellen vorhanden sein, dass es nicht darstellbar ist.

Die Tatsache, dass sich bei Fall 3a in den CD3-positiven Zellen ein Rearrangement für $V\gamma 11$ findet und nicht für $V\gamma 2$, welches jedoch in der CD4 und in der CD8 Subpopulation gefunden wird, lässt sich anhand des Schemas zur T-Zell-Entwicklung (S.16) erklären: es gibt bei den einfachen Thymozyten doppelt positive (d.h. CD4 und CD8-positive) Zellen, bevor CD3 exprimiert wird, da CD3 erst von reifen Thymozyten, die entweder CD4 oder CD8 besitzen, an der Oberfläche getragen wird.

Daher ist Fall 3a auf zwei Stufen der T-Zell-Entwicklung klonal, d.h. auf der Ebene der einfachen Thymozyten (CD4 und CD8) für $V\gamma 2$ und auf der Entwicklungsstufe reifer Thymozyten (CD3) für $V\gamma 11$, das ja auch bei CD8 gefunden wird und nicht noch zusätzlich bei CD4.

In manchen Fällen konnte durch die LCM kein klonales Rearrangement dokumentiert werden, obwohl es in der Standarduntersuchung nachgewiesen worden war.

Eine Erklärung wäre, dass in einzelnen Proben zuwenig DNA gegenwärtig ist. Bei einer Schnittdicke von 10 µm und einem durchschnittlichem Zellausgangsdurchmesser von 30 µm bedeutet dies, dass nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:3 der Zellkern durch die Mikrodisektion erreicht wird. Ein spärliches lymphozytäres Infiltrat erschwert die DNA-Extraktion zusätzlich.

Außerdem ist denkbar, dass eine spätere Deletion rearrangierter Allele die Anzahl der darstellbaren Banden auf dem Gel reduziert (48).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst DNA, die aus Hautbiopsien von 16 Patienten/-innen extrahiert wurde (formalinfixierte Paraffinpräparate) im Hinblick auf die Klonalität der γ -Kette des T-Zell-Rezeptorgens hin untersucht. Anschließend wurden mit Hilfe der Lasermikrodisektion, die Zellen des dermalen, lymphozytären Infiltrats der Patienten in Abhängigkeit ihres Immunphänotyps ebenfalls auf Klonalität hin untersucht.

Um eine mögliche Korrelation der neoplastischen (klonalen) Zellen mit dem Immunphänotyp nachzuweisen, untersuchten wir jeweils separat mit Hilfe von LCM gewonnene Zellen, die CD3, CD4, CD5, CD7 und CD8 exprimierten.

Ein Hauptaugenmerk richtete sich auf die Frage, ob die klonale Entwicklung auf eine bestimmte Lymphozytensubpopulation und damit auf ein bestimmtes Stadium der Lymphozytenentwicklung zurückzuführen sei. Ein Ziel war, durch Feststellung des klonalen Rearrangements einen Rückschluss auf das molekularbiologische Stadium der Erkrankung zu ziehen.

Ein weiteres Augenmerk galt der Frage, unter welchen Bedingungen durch die Lasermikrodisektion eine höhere Sensitivität der Klonalitätsanalyse

erreichbar ist, also wie viele durch Lasermikrodissektion gewonnene Zellen mindestens in die Untersuchung eingeschlossen werden müssen um ein pseudoklonales Bild zu verhindern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

1. Mit Hilfe der Lasermikrodissektion können mehr klonale Rearrangements detektiert werden als durch DNA-Extraktion aus Paraffingewebe. Dadurch, dass genetisches Material der polyklonalen, reaktiven Lymphozyten nicht in die Untersuchung einbezogen wird, steigt die Genauigkeit des molekulargenetischen Ergebnisses.
2. Die sensitive Darstellung von klonalen Rearrangements mit Hilfe der LCM lässt möglicherweise Rückschlüsse auf das molekular-biologische Stadium der Erkrankung zu. Ein oligoklonales Bild in der Klonalitätsanalyse deutet auf ein frühes Stadium der Erkrankung hin während im Tumorstadium häufiger ein monoklonales Bild gefunden wird.
3. Die PCR-Analyse von Läsionen aus frühen Krankheitsstadien wird durch die Methode der Mikrodissektion sensitiver.
4. Da monoklonale Rearrangements gleichzeitig in CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten lokalisiert wurden, vermuten wir, dass die maligne Entwicklung ihren Ausgangspunkt von einem sehr frühen Zeitpunkt der T-Zell Entwicklung nimmt.
5. Auch für die Lasermikrodissektion gilt, dass das Auffinden eines monoklonalen Infiltrats nicht mit der Diagnose eines kutanen T-Zell Lymphoms gleichgesetzt werden darf. Die Korrelation mit histologischen Befund und Klinik ist uneingeschränkt erforderlich.
6. Nach LCM werden häufiger monoklonale Rearrangements für den Genabschnitt V γ 9 dargestellt. Dies kann Folge der höheren Sensitivität sein oder auf einem statistisch bedingten pseudoklonalen Bild beruhen. Um dies zu vermeiden sollten mindestens 30 bis 40, durch LCM gewonnene Zellen mit gleichem Immunphänotyp molekularbiologisch untersucht werden.

7. Kann ein, in der Standardmethode belegtes Rearrangement in mittels LCM gewonnenen Zellen nicht dokumentiert werden, so kann dies (bei einer Schnittdicke von 10 μm und einem durchschnittlichem Zellausgangsdurchmesser von 30 μm) an der erhöhten Schwierigkeit die Zellkerne zu isolieren liegen oder auch an einer möglichen späteren Deletion reorganisierter Allele.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Agnarsson BA, Vonderheid EC, Kadin ME. Cutaneous T cell lymphoma with suppressor/cytotoxic (CD8) phenotype: Identification of rapidly progressive and chronic subtypes. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 22:569-77.
- 2 Alibert JLM. Description des maladies de la peau observees a l'hopital St. Lois. Barrois l'aine`et fils, Paris, 1806.
- 3 Anderson G, Harman BC, Hare KJ et al. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol.* 2000; 12:457.
- 4 Asadullah K, Häussler-Quade A, Gellrich S et al. IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp Dermatol.* 2000; 9:248-51.
- 5 Ashton-Key M, Diss TC, Du MQ et al. The value of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21:743.
- 6 Bertho JM, Mossalayi MD, Dalloul AH et al. Isolation of an early T-cell precursor (CFU-TL) from human bone marrow. *Blood.* 1990; 75:1064.
- 7 Blaschke V, Reich K, Middel P et al. Expression of the CD4+ cell-specific chemoattractant interleukin-16 in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 1999; 113:658-63.
- 8 Bonner RF, Emmert-Buck M, Cole K. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997; 278(5342): 1481,1483.
- 9 Burg G, Dummer R, Haeffner A et al. From inflammation to neoplasia: Mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol.* 2001; 137:949.
- 10 Cerroni L, Arzberger E, Ardigio M et al. Monoclonality of intraepidermal T Lymphocytes in early mycosis fungoides detected by molecular analysis after laser-beam-based microdissection. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:1154-7.
- 11 Coupland SE, Hummel M, Stein H. Lymphatisches System und Differenzierung von B und T-Lymphozyten. *Der Pathologe.* 2000; 21:106-12.

- 12 Dobbeling U, Dummer R, Laine E et al. Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*. 1998; 92:252-58.
- 13 Dummer R, Michie S, Kell D et al. Expression of BCL-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J Cutan Pathol*. 1995; 22:11-17.
- 14 Dummer R, Willers J, Kamarashev J et al. Pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Semin Cutan Med Surg*. 2000; 19:78-86.
- 15 Fitch F, Lancki D, Gajewski T. T-cell mediated immune regulation in: *Fundamental Immunology*, 3rd ed, New York, Raven Press, 1993; 733-56.
- 16 Gellrich S, Lukowsky A, Schilling T et al. Microanatomical compartments of clonal and reactive T cells in Mycosis fungoides: molecular demonstration by single cell polymerase chain reaction of T cell receptor gene rearrangements. *J Invest Dermatol*. 2000; 115:620-4.
- 17 Ghosh SK, Abrams JT, Terunuma H et al. Human T-cell leukemia virus type I tax/rex DNA and RNA in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 1994; 84:2663-71.
- 18 Graf A, Kaudewitz P, Simon M et al. Detection of clonality of cutaneous T-cell lymphomas using polymerase chain reaction. *Pathologe*. 1996; 17:446-50.
- 19 Greene MH, Dalager NA, Lamberg SI et al. Mycosis fungoides: Epidemiologic observations. *Cancer Treat Rep*. 1979; 63:597-606.
- 20 Hall WW, Liu CR, Schneewind O et al. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science*. 1991; 253:371.
- 21 Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84:1361.
- 22 Hoppe RT, Wood GS, Abel EA. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome: pathology, staging and treatment. *Curr Probl Cancer*. 1990; 14:293.
- 23 Jaffe ES, Chan JK, Su IJ et al. Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric T/Natural killer cell lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:103-11.
- 24 Kaudewitz P, Gummer H, Flaig MJ. Kutane Lymphome. *Manual Maligne Lymphome*, Tumorzentrum München. 2004; 161-8.

- 25 Kaye FJ, Bunn PA Jr, Steinberg SM et al. A randomized trial comparing electron-beam radiation and chemotherapy with topical therapy in the initial treatment of mycosis fungoides. *N Engl J Med.* 1989; 321:1784.
- 26 Kim Y, Hoppe R. Mycosis fungoides and the Sezary syndrome. In: *Cancer Medicine* 4th ed, Holland J (Ed), Williams and Wilkins, Baltimore, 1997, p. 2797
- 27 Li Y, Hisha H, Inaba M et al. Evidence for migration of donor bone marrow stromal cells into recipient thymus after bone marrow transplantation plus bone grafts: A role of stromal cells in positive selection. *Exp Hematol.* 2000; 28:950-60.
- 28 Lukowsky A, Muche JM, Sterry W et al. 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.* 2000; 115:254-259.
- 29 Medeiros JL, Bagg A, Cossman J. Application of molecular genetics to the diagnosis of hematopoietic neoplasms. In: *Neoplastic Hematopathology*, Knowles DM (Ed), Williams and Wilkins, Baltimore 1992, 263-98.
- 30 Nickoloff BJ, Griffiths CE. Intraepidermal but not dermal T-lymphocytes are positive for a cell-cycle-associated antigen (Ki-67) in mycosis fungoides. *Am J Pathol.* 1990; 136:261-6.
- 31 Ralfkiaer E: Immunohistochemical markers for the diagnosis of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol.* 1991; 8:62-72.
- 32 Ralfkiaer E, Jaffe ES. Mycosis fungoides and Sézary-Syndrome. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Verdiman JW. *Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues.* IARC Press, Lyon 2001, 216-20.
- 33 Romagnani S. Human Th-1 and Th-2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12:256-57.
- 34 Saed G, Fivenson DP, Naidu Y et al. Mycosis fungoides exhibits a Th-1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th-2-type profile. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:29-33.
- 35 Safai B, Myskowski PL, Dupont B et al. Association of HLA-DR5 with mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* 1983; 80:395.
- 36 Schiller PI, Flaig MJ, Puchta U et al. Detection of clonal T-cells in lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 2000; 292:568-9.

- 37 Schuhmann K, Flaig MJ, Bertsch HP et al. Klonalitätsanalyse kutaner Pseudolymphome. *Akt. Dermatol.* 1999; 25:99-101.
- 38 Shapiro PE, Warburton D, Berger CL et al. Clonal chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1987; 28:267-76.
- 39 Shapiro PE, Pinto FJ. The histologic spectrum of mycosis fungoides/Sezary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma). A review of 222 biopsies, including newly described patterns and the earliest pathologic changes. *Am J Surg Pathol.* 1994; 18:645-67.
- 40 Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med.* 1988; 167:225-30.
- 41 Smoller BR, Bishop K, Glusac E et al. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19:1423.
- 42 Terhorst C, van Agthoven A, LeClair K et al. Biochemical studies in the human thymocyte antigens T6, T9, and T10. *Cell.* 1981; 23:771.
- 43 Vega F, Luthra R, Medeiros LJ et al. Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and its relationship to clinical course. *Blood.* 2002; 100:3369.
- 44 Volkenandt M, Soyer HP, Cerroni L et al. Molecular detection of clone-specific DNA in hypopigmented lesions of a patient with early evolving mycosis fungoides. *Br J Dermatol.* 1993; 128:423-8.
- 45 Vonderheid EC, Tan E, Sobel EL et al. Clinical implications of immunologic phenotyping in cutaneous T cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol.* 1987; 17:40-52.
- 46 Whittemore AS, Holly EA, Lee IM et al. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immun response: A case control study. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81:1560.
- 47 Willemze R et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood* 1997; 90:354-71.
- 48 Wood GS, Weiss LM, Warnke RA et al. The immunopathology of cutaneous lymphomas: Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics. *Semin Dermatol.* 1986; 5:334.
- 49 Wood GS, Hong SR, Sasaki DT et al. Leu/CD7 antigen expression by CD3+T-cells: Comparative analysis of skin and blood in mycosis fungoides/Sézary syndrome relative to normal blood values. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 22:602.

- 50** Wood GS, Tung RM, Haeffner A et al. Detection of clonal T-cell receptor γ gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Invest Dermatol.* 1994; 103:34-41.
- 51** Wood GS, Schaffer JM, Boni R et al. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 1997; 150:667-73.
- 52** Wu K, Lund M, Bang K et al. Telomerase activity and telomere length in lymphocytes from patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer.* 1999; 86:1056-63.
- 53** Yazdi AS, Medeiros LJ, Puchta U et al. Improved detection of clonality in cutaneous T-cell lymphomas using laser capture microdissection. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(8): 486-91.

7. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C. A. Sander für die immer freundliche und gewissenhafte Betreuung während der ganzen Zeit danken.

Frau U. Puchta bin ich für Ihre überaus hilfsbereite und kompetente Unterstützung bei den molekularbiologischen Techniken und der Datenverwaltung zu großem Dank verpflichtet.

Herrn M. Conrad danke ich sehr für die geduldige Hilfe bei allen graphischen Fragen und die Bereitstellung der ganzen Software.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Plewig, der als Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie meine Tätigkeit als Doktorandin unterstützt hat.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thaller
Vorname: Eva
Geburtsdatum / -ort: 09.02.1976, Vilsbiburg
Anschrift: Sternstr. 18
80538 München
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1982 – 07/1986 Grundschule Eggenfelden
09/1986 – 06/1995 Karl v. Closen Gymnasium Eggenfelden,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1995 – 03/1996 University of Bath (England): Biologie
11/1996 – 03/1997 Universität Regensburg: Biologie
05/1997 – 05/2003 LMU München: Humanmedizin
03/1999 Ärztliche Vorprüfung
03/2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktika

Famulaturen

08/1999 Chirurgische Abteilung d. KH Eggenfelden
08/2000 Dermatologische Klinik der LMU München
04/2001 Gynäkologische Abteilung d. KH Harlaching
09/2001 Allgemeinarztpraxis: Dr. med. Thaller ,
Mühldorf

Praktisches Jahr

04/2002 – 08/2002

Neurologische Abteilung KH Harlaching

08/2002 – 11/2002

Medizinische Poliklinik d. LMU München

11/2002 – 03/2003

Chirurgische Abteilung Krankenhaus
Neuperlach

Berufliche Nebentätigkeit

11/1998 – 01/2003

Schlaflaborassistentin der Med. Klinik LMU

Berufliche Tätigkeit

Seit 05/2003

Ärztin in der neurologischen Abteilung des
akademischen Lehrkrankenhauses München-
Harlaching