

## 4 ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in dem Aufbau eines empfindlichen, auf der PCR beruhenden Nachweissystems für maligne T-Zell-Lymphoproliferationen. Dabei war die Hauptanforderung, daß das verwendete Primersystem in der Lage ist -mittels weniger Ansätze- alle theoretisch möglichen TCR- $\beta$  Genumlagerungen nachzuweisen. Desweiteren sollte die Analyse von degenerierter DNA aus Formalin-fixiertem Paraffinmaterial möglich sein, da dieses mehr als 90 % des klinischen Untersuchungsgutes repräsentiert.

### 4.1 Methodische Entwicklung

#### 4.1.1 Etablierung einer TCR- $\beta$ PCR mittels hochdegenerierter J $\beta$ -Konsensusprimer

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die bisher publizierten TCR- $\beta$  Primersysteme auf ihre Eignung für die obige Anforderung getestet. Unter den wenigen Veröffentlichungen, die sich mit dem Klonalitätsnachweis mittels TCR- $\beta$  PCR befaßt haben, schien besonders die von der Arbeitsgruppe Kneba et al.<sup>34</sup> veröffentlichte Methode vielversprechend zu sein.

Diese Methode beruht auf der Anwendung von vier hochdegenerierten J $\beta$ -Konsensusprimern (Tab. 4), die alle J $\beta$ -Gensegmente erfassen. Diese Primer werden in einer geschachtelten PCR (semi-nested-PCR) in Kombination mit einem bereits publizierten Konsensusprimer<sup>50</sup> für alle Gensegmente der V $\beta$ -Region eingesetzt. Das Besondere an diesen Primern ist, daß jeweils ein einziger Primer alle hochvariablen Segmente der J $\beta$  1.1 - 1.6 bzw. der J $\beta$  2.1 - 2.7 Familie erkennen sollte. Hierfür enthalten diese Primer 1.) mehrere sog. "Whobble-Positionen" (bis zu 5 whobbles) und 2.) zusätzlich Inosinbasen (Tab. 4). Inosine sind Purinanaloga, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in der Lage sind, Brückenbindungen nicht nur mit einer bestimmten Base (z.B. A-T und G-C), sondern auch Basenpaarungen mit Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin (I-G, I-A, I-C, I-T) einzugehen<sup>51,52,53</sup>.

**Tab. 4: J $\beta$ -Konsensusprimer nach Kneba et al.<sup>34</sup>**

<b>J<math>\beta</math> I (1)</b>	<b>5' (T/A)GAG (C/T)CI(G/A)GT (C/T) CCIICCAAAA 3'</b>
<b>J<math>\beta</math> I (2)</b>	<b>5' ACIG(T/A)GAG(C/T)CI(G/A)GT(C/T)CC 3'</b>
<b>J<math>\beta</math> II (1)</b>	<b>5' T(G/C)AGCC(T/G)IGTGCCIG(G/C)ICCGAA 3'</b>
<b>J<math>\beta</math> II (2)</b>	<b>5' ACIGT(G/C)AGCC(T/G)IGTGCC 3'</b>

I= Inosin; (1) entsprechen Primer der Primäramplifikation, und (2) der Reamplifikation.

Mit diesem Primersystem analysierten Kneba et al. überwiegend Blutproben von 8 Patienten mit einer T-Zell Leukämie (4) bzw. einem T-Zell-Lymphom (4). In 7 der 8 Fälle (87,5 %) konnte eine klonale TCR- $\beta$  Umlagerung dargestellt werden. Für diesen Nachweis wurde ausschließlich hochmolekulare DNA aus Gefriermaterial sowie aus Blut verwendet.

Mit dieser Methode konnten wir, anhand eigener Untersuchungen reproduzierbare Klonalitäten ausschließlich an T-Zell-Linien sowie an T-Zell-Lymphomen mit einem großen Tumoranteil erzielen<sup>54</sup> (z.B. ALC-T). Die klonalen Amplifikate waren jedoch stets von kräftigen Hintergrundsignalen begleitet. Darüber hinaus zeigte sich im Laufe der Untersuchung von weiteren Proben mehrere Probleme, die sich mit der von Kneba publizierten Methode nicht lösen ließen:

1. Monoklonale T-Zellpopulationen von T-Zell-Lymphomen mit einem geringeren Tumoranteil (von ca. < 15 %), wie beim angioimmunoblastischen Lymphom, der Mycosis fungoides, dem intestinalen T-Zell-Lymphom oder Minimalinfiltrate, konnten nicht detektiert werden.
2. Die Untersuchung von degenerierter DNA wie aus Formalin-fixiertem Paraffinmaterial war nur eingeschränkt möglich.

Neben diesen inhaltlichen Problemen zeigte sich auch ein weiteres eher technisches Problem. Die "erfolgreiche" Anwendung der degenerierten "Kneba-Primer" zeigte eine starke Abhängigkeit von der Primersynthese. Offensichtlich entstehen aufgrund der starken Degeneriertheit der J $\beta$ -Primer sehr heterogene Primergemische, die häufig nicht zu spezifischen bzw. reproduzierbaren PCR-Ergebnissen führen.

Diese konnten auch unter veränderten Reaktionsbedingungen, wie Auftrennung der PCR in zwei J $\beta$ -familienspezifische Ansätze, Änderung der MgCl<sub>2</sub>- und Primer-Konzentration, Änderung der Primerbindungstemperatur ("annealing-temperature"), Verwendung von hochgereinigten (HPLC) Primern oder verschiedenen Polymerasen (Taq- oder Proofreading - Polymerasen wie z.B. UITma-Polymerase™), nicht positiv beeinflusst werden.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß der Einsatz hochdegenerierter J $\beta$ -Konsensusprimer nur für die Analyse von hochmolekularer DNA (Gefriermaterial) mit einem hohen Anteil maligner T-Zellen geeignet ist (z.B. T-Zell-Leukämien). Allerdings lassen sich mit dieser Technik weder T-Zell-Lymphome mit einem geringen Tumoranteil noch DNA aus Formalin-fixiertem Paraffinmaterial erfolgreich untersuchen. Aus diesen Gründen war die Entwicklung einer neuen TCR- $\beta$  PCR, die den Ansprüchen der Routinediagnostik gerecht wird, notwendig.

#### **4.1.2 Eigene Entwicklung einer familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR**

Aufbauend auf den Erfahrungen mit den degenerierten J $\beta$ -Konsensusprimer entwickelten wir ein Primersystem, das ausschließlich aus J $\beta$ -Primern besteht, die eine 100 %ige Homologie zu den jeweiligen J $\beta$ -Segmenten aufweisen, sog. familienspezifische J $\beta$ -Primer.

Aufgrund der ausgeprägten Sequenzunterschiede der 13 J $\beta$ -Segmente (J $\beta$  1.1-1.6 und J $\beta$  2.1-2.7) mußten 13 verschiedene J $\beta$ -Primer generiert werden, die zwar komplementär zur Zielsequenz sein müssen, aber sich gegenseitig nicht beeinflussen sollen (Primer-Primerbindung).

#### **4.1.3 Primerselektion für die J $\beta$ -Segmente**

Um eine 100 % -ige Homologie zwischen Zielsequenz und Primer zu erreichen, haben wir für die J $\beta$ -1-Region (J $\beta$  1.1-1.6) sechs familienspezifische Primer konstruiert, die alle eine Länge von 17 Basen haben. Ferner sind diese Primer so gewählt, daß sie ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen (wie G-C-Gehalt und Schmelztemperaturen) und somit ähnlichen Reaktionsbedingungen unterliegen. Nach den gleichen Kriterien haben wir für die J $\beta$ -2-

Region (J $\beta$  2.1-2.7) insgesamt sieben familienspezifische Primer konstruiert. Die Bindungspositionen im Exon sind so gewählt, daß die Produktlängen im Bereich von ca. 250 Basenpaare ( $\pm$  15 bp) liegen und somit für Formalin-fixiertes Material geeignet sind. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität erfolgte die TCR- $\beta$  PCR in zwei Schritten, einer Primäramplifikation und einer Reamplifikation (Tab. 5).

**Tab. 5: Familienspezifische J $\beta$ -Primer nach Assaf et al.<sup>70</sup>**

	<u>Primäramplifikation</u>						<u>Reamplifikation</u>							
	<b>J<math>\beta</math>FS1A</b>						<b>J<math>\beta</math>FS1</b>							
	5'					3'	5'						3'	
J $\beta$ 1.1	ACT	GTG	AGT	CTG	GTG	CC	TGA	GTC	TGG	TGC	CTT	GTC	CAA	A
J $\beta$ 1.2	ACG	GTT	AAC	CTG	GTC	CC	TTA	ACC	TGG	TCC	CCG	AAC	CGA	A
J $\beta$ 1.3	ACA	GTG	AGC	CAA	CTT	CC	TGA	GCC	AAC	TTC	CCT	CTC	CAA	A
J $\beta$ 1.4	ACA	GAG	AGC	TGG	GTT	CC	AGA	GCT	GGG	TTC	CAC	TGC	CAA	A
J $\beta$ 1.5	ATG	GAG	AGT	CGA	GTC	CC	AGA	GTC	GAG	TCC	CAT	CAC	CAA	A
J $\beta$ 1.6	ACA	GTG	AGC	CTG	GTC	CC	TGA	GCC	TGG	TCC	CAT	TCC	CAA	A
	<b>J<math>\beta</math>FS2A</b>						<b>J<math>\beta</math>FS2</b>							
J $\beta$ 2.1	ACG	GTG	AGC	CGT	GTC	CC	TGA	GCC	GTG	TCC	CTG	GCC	CGA	A
J $\beta$ 2.2	ACG	GTC	AGC	CTA	GAG	CC	TCA	GCC	TAG	AGC	CTT	CTC	CAA	A
J $\beta$ 2.3	ACT	GTC	AGC	CGG	GTG	CC	TCA	GCC	GGG	TGC	CTG	GGC	CAA	A
J $\beta$ 2.4	ACT	GAG	AGC	CGG	GTC	CC	AGA	GCC	GGG	TCC	CGG	CGC	CGA	A
J $\beta$ 2.5	ACC	AGG	AGC	CGC	GTG	CC	CGA	GCC	GCG	TGC	CTG	GCC	CGA	A
J $\beta$ 2.6	ACG	GTC	AGC	CTG	CTG	CC	TCA	GCC	TGC	TGC	CGG	CCC	CGA	A
J $\beta$ 2.7	ACC	GTG	AGC	CTG	GTG	CC	TGA	GCC	TGG	TGC	CCG	GCC	CGA	A

#### 4.1.4 Primerselektion für die V $\beta$ -Segmente

Für die V $\beta$ -Region haben wir den von der Arbeitsgruppe Lessin et al.<sup>50</sup> publizierten Konsensusprimer verwendet (V $\beta$ pan), der zu den 28 V $\beta$ -Familien insgesamt eine Homologie zwischen 88 % und 100 % aufweist. Zusätzlich haben wir am 5'-Ende des Primers Modifikationen eingeführt, so daß die ersten 10 Basen des Primers (V $\beta$  mod) eine 100 %-ige Homologie zu allen V $\beta$ -Keimbahnsequenzen haben und dadurch eine höhere Bindungseffizienz gewährleisten (Tab. 6).

Tab. 6: Konstruktion des V $\beta$ pan-Primers sowie des modifizierten V $\beta$  mod.

		5'-Sequenz-3'(16 mer)	Consensus
V $\beta$	1	T G T A C T G G T A C C A A C A	100%
V $\beta$	2	T G T T T T G G T A T C G T C A	94%
V $\beta$	3	T G T T C T G G T A T C G A C A	94%
V $\beta$	4	T G T T C T G G T A C C G T C A	94%
V $\beta$	5	T G T C C T G G T A C C A A C A	100%
V $\beta$	6	T T T A C T G G T A C C G A C A	100%
V $\beta$	7	T G T A T T G G T A C A A G C A	88%
V $\beta$	8	T T T T C T G G T A C A G A C A	88%
V $\beta$	9	T G T A T T G G T A T A A A C A	94%
V $\beta$	10	T T T A C T G G T A T C G T C A	94%
V $\beta$	11	T G T A C T G G T A T C A A C A	100%
V $\beta$	12	T G T A C T G G T A T C A A C A	100%
V $\beta$	13	T G T C C T G G T A T C G A C A	100%
V $\beta$	14	T G T C C T G G T A T C G A C A	100%
V $\beta$	15	T G T A C T G G T A T C G A C A	100%
V $\beta$	16	T T T A T T G G T A T C G A C A	100%
V $\beta$	17	T G T A C T G G T A C C G A C A	100%
V $\beta$	18	T T T A C T G G T A T C G G C A	94%
V $\beta$	19	T T T A T T G G T A T C A A C A	100%
V $\beta$	20	T A T A C T G G T A C C G A C A	94%
V $\beta$	21	T T T A C T G G T A C C A G C A	94%
V $\beta$	22	T C T A T T G G T A C A G A C A	88%
V $\beta$	23	T C T A C T G G T A C C A G C A	88%
V $\beta$	24	T G T A C T G G T A C C A G C A	94%
V $\beta$	21*	T T T A C T G G T A C C T G C A	88%
V $\beta$	22*	T G T A C T G G T A C C A G C A	94%
V $\beta$	23*	T C T A T T G G T A C A G A C A	88%
V $\beta$	24*	T G T A C T G G T A C C A G C A	94%

**V $\beta$  pan**                    T(T/G)T(A/C)(C/T)TGGTA (T/C)C(G/A)(AT)CA

**V $\beta$  mod**                    T (T/G)T(A/C)(C/T)TGGTA (T/C)C(G/A)(ATG)CA

Dargestellt sind die homologen Sequenzabschnitte der einzelnen V $\beta$ -Familien in Relation zur Homologie des V $\beta$ pan-Primers nach Lessin et al.<sup>50</sup> sowie der modifizierte V $\beta$  mod-Primer. V $\beta$ -Keimbahn-Sequenzen nach Sims et al.<sup>13</sup> sowie \*Ferradini et al.<sup>55</sup>.

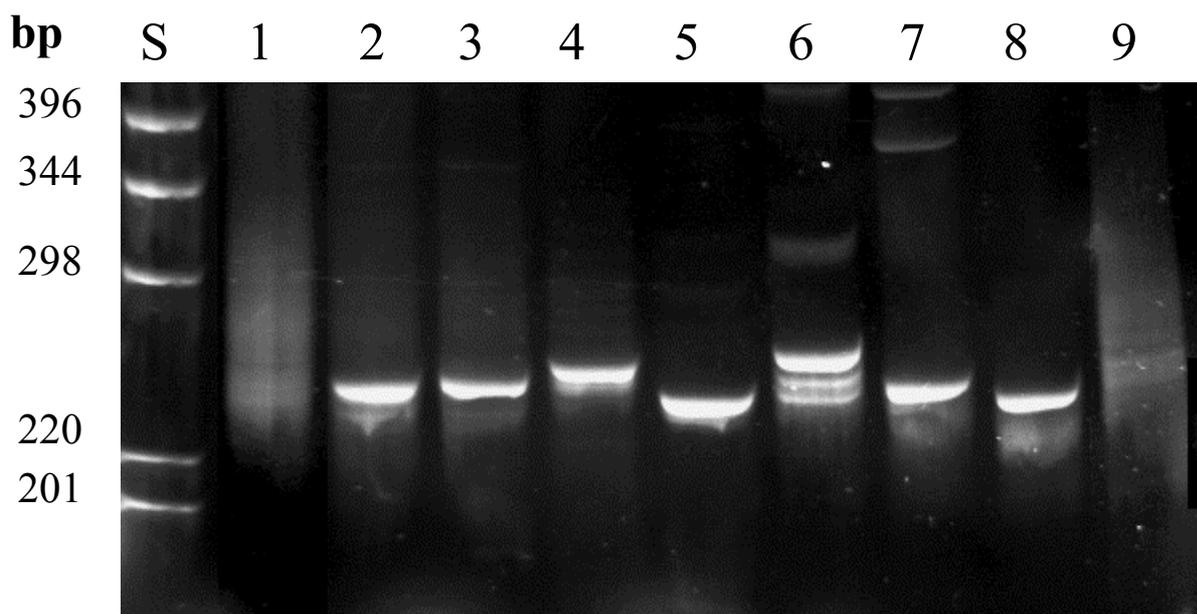
#### 4.1.5 Etablierung der Reaktionsbedingungen

Zur Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen untersuchten wir zunächst bekannte T-Zell-Linien, deren monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung gesichert und aus der Literatur bekannt sind (z.B. MOLT 4 und Jurkat). Als polyklonale Kontrollen untersuchten wir normales schockgefrorenes lymphatisches Gewebe (Tonsille, Lymphknoten). Zu Beginn führten wir die familienspezifische TCR- $\beta$  PCR als semi-nested-PCR (geschachtelte PCR) in einem einzigen Reaktionsansatz durch, d.h. alle familienspezifischen J $\beta$ -Primer (insgesamt 13) befanden sich zusammen mit dem V $\beta$ mod-Primer in einem Reaktionsgefäß (PCR-Tube). Dabei kam es selbst unter stringenten Bedingungen (niedrige MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, hohe "annealingtemperature") zur Bildung einer Vielzahl unspezifischer Nebenprodukte (Primerdimere, unspezifische Primer-DNA-Bindung), die die spezifische Amplifikation der TCR- $\beta$  Umlagerung verhinderten. Zur Lösung dieses Problems führten wir zwei getrennte Reaktionsansätze durch: 1.) V $\beta$  mod in Kombination mit den J $\beta$ FS1-Primern, und 2.) V $\beta$  mod in Kombination mit den J $\beta$ FS2-Primern. Beide Ansätze wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Aufteilung in zwei verschiedene Reaktionsschritte führte dazu, daß die Bildung unspezifischer Nebenprodukte weitgehend verhindert werden konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen folgten die Optimierungsexperimente mit verschiedenen Salz-, DNA- und Primerkonzentrationen sowie verschiedenen "Annealingtemperaturen" und Zyklenzahlen. Dabei wurde bei allen Versuchen eine Technik angewendet, bei der durch eine Wachsschicht (AmpliWax, Perkin Elmer) die Primer und die DNA von der Taq-Polymerase bis zu einer Temperatur von 80°C getrennt bleiben, so daß die PCR erst bei einer höheren Temperatur startet ("hot-start-technique"). Hierdurch wird die bei niedrigeren Temperaturen mögliche Bildung unspezifischer Produkte während des Aufheizens des Reaktionsgemisches weitgehend verhindert.

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigten sich nun die PCR-Produkte verschiedener T-Zell-Linien im Polyacrylamidgel als scharf abgegrenzte, signalstarke Banden (monoklonal). PCR-Produkte von normalem lymphatischem Gewebe zeigte sich als breiter Bandenschmier (polyklonal) von über ca. 30 Basenpaaren. Die nachfolgenden Untersuchungen von Gefriermaterial verschiedener benignen und malignen Lymphoproliferationen zeigten bei gleichen Reaktionsbedingungen reproduzierbare

Ergebnisse. Nach Etablierung der TCR- $\beta$  PCR an Gefriermaterial untersuchten wir als weiteres Probengut Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe.

Die Analyse von Formalin-fixiertem Gewebe zeigte im Polyacrylamidgelbild spezifische und reproduzierbare Amplifikate, die allerdings in ihrer Intensität wesentlich schwächer sind als die aus Gefriermaterial gewonnenen PCR-Produkte. Unter der Annahme, daß für eine erfolgreiche Amplifikation eine größere Menge degenerierter DNA benötigt wird, wurden verschiedene DNA-Mengen eingesetzt. Dabei zeigten sich die besten Resultate bei einer DNA-Menge von ca. 250 ng Formalin-fixierter DNA (DNA aus Gefriermaterial ca. 100 ng). Die aus einer höheren Formalin-fixierten DNA-Menge resultierenden Amplifikate stellen sich mit einer starken Intensität dar, die sich von PCR-Produkten aus Gefriermaterial kaum noch unterscheiden (Abb. 4).



**Abb. 4:** Repräsentative Darstellung von TCR- $\beta$  PCR-Produkten mittels eines Polyacrylamidgels (6 %).

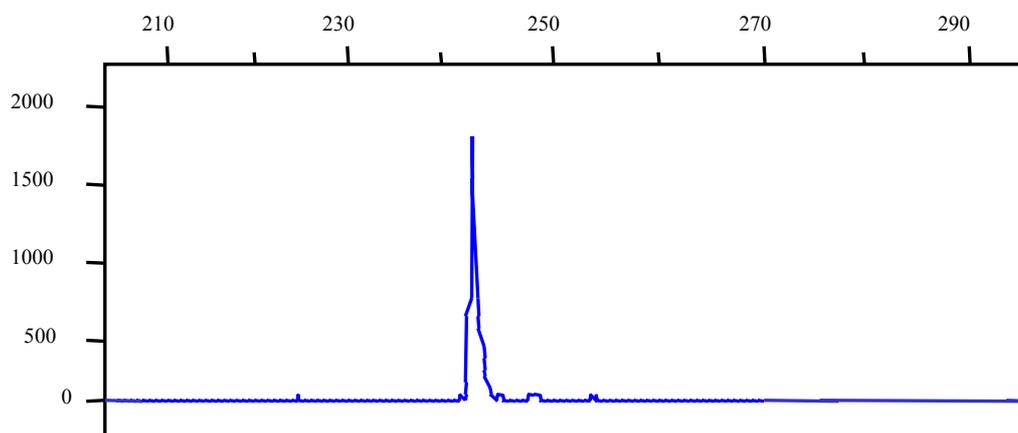
(S) DNA-Größenstandard. (1) normales Tonsillengewebe. (2) CTCL, Haut (Pat. 18). (3) CTCL, infiltrierter Lymphknoten (Pat.18). (4) peripheres T-Zell-Lymphom. (5) T-ALL. (6) anaplastisch großzelliges Lymphom vom T-Zell-Typ. (7) intestinales T-Zell-Lymphom. (8) T-Zell-Linie Hut 102. (9) B-Zell-Lymphom. 1,2,8,9 stammen aus DNA von Gefriermaterial, während 3,4,5,6,7 aus DNA von Formalin-fixiertem Gewebe stammen.

#### **4.1.6 Etablierung der GENESCAN-Analyse**

Eine wesentliche Verbesserung der Analysetechniken zum Nachweis von TCR- $\beta$  Umlagerungen wurde im Rahmen dieser Arbeit durch den Einsatz Fluoreszenzfarbstoffmarkierter TCR- $\beta$  Primer und die computergestützte Analyse von PCR-Produkten in einem automatischen DNA-Sequenzierer erreicht. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte analog zur Analyse von Sequenzreaktionen in einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgel. Das entwickelte Verfahren ermöglicht durch hochauflösende Größenbestimmung und Messung der Fluoreszenzintensität eine Trennschärfe von einem Basenpaar und damit eine schnelle und objektive Identifikation mono- bzw. polyklonaler TCR- $\beta$  PCR-Produkten. Die Abgrenzung monoklonaler PCR-Produkte von einem signifikanten polyklonalen Hintergrund, wird mit einem hohen Maß an Sicherheit gewährleistet.

#### 4.1.7 Spezifität der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR

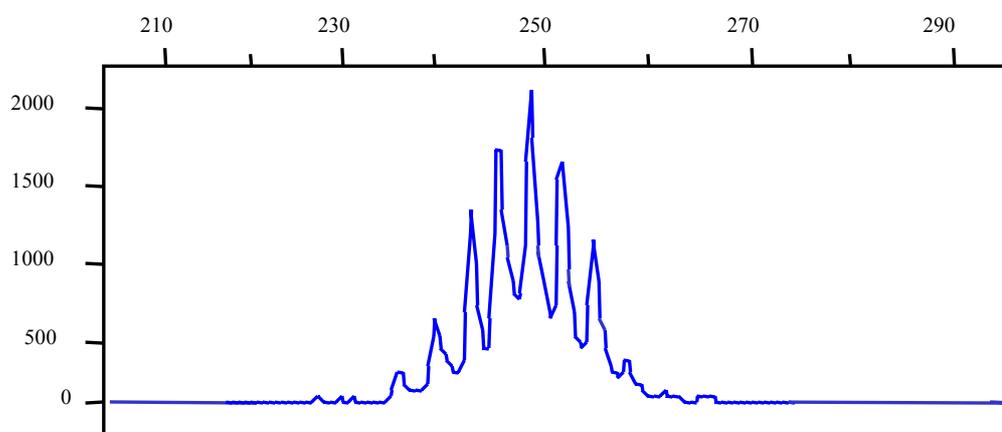
Um die Spezifität der neuentwickelten TCR- $\beta$  PCR zu überprüfen, untersuchten wir zunächst verschiedene T-Zell-Linien mit T-Zell Immunophänotyp (Hut 102, MOLT4, Jurkat, DHL-1, Karpas, Del, MO-T, PEER). Im Polyacrylamidgel bildeten sich diese PCR-Amplifikate als solitäre, scharf begrenzte Banden dar. In der GENESCAN-Analyse ist diese *monoklonale* T-Lymphozytenpopulation als solitärer Peak ohne signifikanten Hintergrund repräsentiert (Abb. 5). Dieses Muster zeigte sich auch bei T-Zell-Lymphomen/Leukämien mit einem hohen Tumorzellgehalt (50-90 %).



**Abb. 5:** GENESCAN-Analyse der TCR- $\beta$  Umlagerung der T-Zell-Linie HutGut. Solitärer Peak (243 bp) als Beispiel einer monoklonalen T-Zellpopulation. Die graphische Darstellung der Elektropherogramme erfolgt als quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität (y-Achse) als Funktion der PCR-Fragmentlänge in bp (x-Achse).

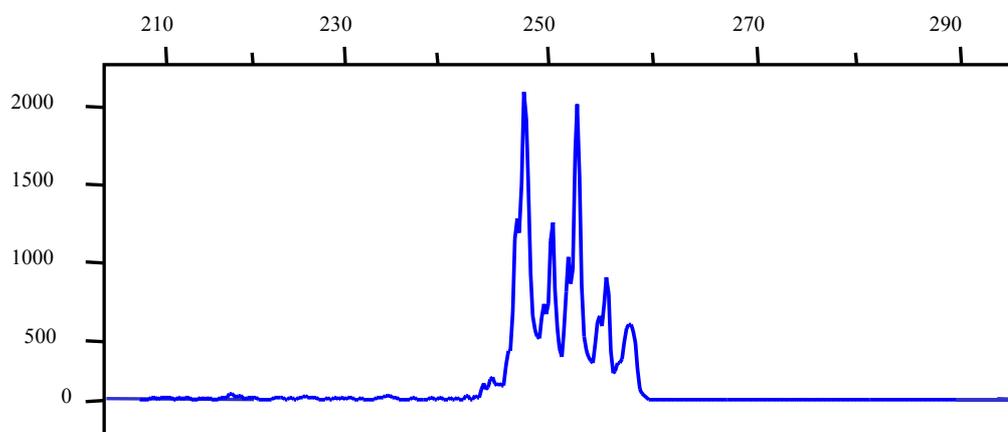
Die Analyse von 10 Gewebeproben reaktiver Lymphknotenveränderungen, 15 B-Non-Hodgkin-Lymphomen und 10 normale Blutproben gesunder Probanden ergaben in der Regel im Polyacrylamidgel einen Bandenschmear über eine Breite von ca. 30 Basenpaaren, das als *polyklonales* Bild bezeichnet wird. In der GENESCAN-Analyse zeichneten sich die *polyklonalen* T-Lymphozyten durch ein Bandenspektrum von TCR- $\beta$  PCR-Produkten mit einem der Gauß'schen-Kurve ähnelndem Verteilungsmuster aus (Abb. 6). Die TCR- $\beta$

Amplifikate lagen in einem Bereich von 234 bis 261 Basenpaare (J $\beta$ FS1) bzw. 237 bis 264 (J $\beta$ FS2) Basenpaare. Dabei war besonders auffällig, daß sich zwischen den einzelnen PCR-Produktgrößen regelmäßig 3 bp-Abstände zeigten. Diese Abstände entsprechen einem kodierenden Triplet (Kodon). Dieses Ergebnis kann als Hinweis dafür gedeutet werden, daß die meisten TCR- $\beta$  Umlagerungen ein offenes Leseraster (“in frame” rearrangements) haben und damit funktional sind.



**Abb. 6:** GENESCAN-Analyse der TCR- $\beta$  Umlagerung von normalem Tonsillengewebe. Man erkennt eine polyklonale Proliferation mit einer “Gaußschen Verteilungskurve” ähnlichem Bild mit einer Fragmentverteilung von 234 bp – 261 bp.

Die Untersuchungen von reaktiven extranodalen Läsionen wie z.B. entzündliche Hautläsion (12 Fälle mit Psoriasis vulgaris, 4 Fälle mit chronischer Dermatitis) ergaben meist ein *oligoklonales* Bild, bestehend aus 3-5 PCR-Produkten (Abb. 7). Diese PCR-Produkte stellten sich im Polyacrylamidgelbild als einige wenige z.T. dominante Banden dar, die sich erst im GENESCAN-Bild als mehrere unterschiedlich große Peaks zeigten.



**Abb. 7:** GENESCAN-Analyse der TCR- $\beta$  Umlagerung einer reaktiven extranodalen Veränderung (Psoriasis). Wenige Peaks als Beispiel einer oligoklonalen TCR- $\beta$  Umlagerung.

#### 4.1.8 Sensitivität der familienspezifischen TCR- $\beta$ PCR

Die Sensitivität der beiden familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der gut charakterisierten T-Zell-Linien Hut 102 (JBFS1-Umlagerung) und MOLT4 (JBFS2-Umlagerung) in einer normalen menschlichen Tonsille ermittelt. Alle PCR-Nachweise waren in der Lage, etwa 1 % klonal umgelagerter T-Zellen in einem polyklonalen Hintergrund (1 ng T-Zell-Linien DNA in 100 ng Tonsillen DNA) nachzuweisen.

#### 4.1.9 Sequenzanalyse von TCR- $\beta$ PCR-Produkten

Aufgrund des geringen Hintergrundsignals der familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR konnten die entstandenen monoklonalen Amplifikate ohne vorherige Klonierungsstrategien direkt sequenziert werden. Insgesamt wurden 36 Amplifikate von histologisch/immunhistologisch gesicherten T-NHL und 3 T-Zell-Linien sequenziert und mit den V $\beta$ - und J $\beta$ -Keimbahnsequenzen verglichen. Alle Sequenzen der umgelagerten V $\beta$ - und J $\beta$ -Segmente konnten durch den Vergleich mit dem Datenbankeintrag identifiziert werden. Die Länge der gesamten N-D-N-Region war sehr variabel und schwankte zwischen 3 und 27 Basen. Die Reste der umgelagerten D-Segmente waren 3-14 Basen lang, so daß in vielen Fällen eine eindeutige Identifikation des umgelagerten D1- oder D2-Segments nicht möglich war. Die Sequenzen der Zell-Linien Hut 102 und MOLT4 waren identisch mit den publizierten Sequenzen. Von 6 Patienten wurden zwei oder mehr Amplifikate sequenziert, die von Gewebeproben unterschiedlicher Lokalisation oder von verschiedenen Zeitpunkten stammten. In den verschiedenen Gewebeproben eines Patienten wurde jeweils die identische klonspezifische Sequenz ermittelt.

**Tab. 7: Nukleotidsequenzen von TCR- $\beta$ -CDR3-Junktionen**

	Entität	3'V $\beta$	N-D-N'	5'J $\beta$	v $\beta$	D $\beta$	J $\beta$
1	CTCL	TGTGCCAGT	CAATAAAGGGAGGGT CTGATCT	CTACGAGCAGTACTTCGGGCCnGGCAC CGGTTTC	V19	D2	J2.7
2	CTCL	TGTGCCAGT	CAATAAAGGGAGGGT CTGATCT	CTACGAGCAGTACTTCGGCCCCGGnAC CGGCTCAGGCTCCAA	V19	D2	J2.7
3	CTCL	TGTGCCAGTAGT	TCGGC	AGCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGAT GGACTCG	V7.2	Dn	J1.5
4	CTCL	TGTTCCAGCAGC	TGGGACAGGGGTAG	CTCCTACGAGCAGTACTTCGGCnCC	V5.4	D1	J2.7
5	CTCL	TGTGCCAGCAGC	TGGGACAGGGGTAG	CTCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCCC	V5.4	D1	J2.7
6	CTCL	TGTGCCAGCAGC	CCGNTACAGGGA	TCCTACGANNAGNACTTCGGCGCCGGC NCAGNCTCATNATCNTA	V7.9	D2	J2.7
7	CTCL	TGCGCCAGCAGT	TTACTAAAACCAC	CTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGG GACCAGTTAAA	V10.1	D2	J1.2
8	ALC-T	TGTGCCAGTAGTATA G	CACGCGGACCCTA	TAGCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGA GGGACTCGACT	V19.1	D2	J1.5
9	ALC-T	TGTGCCAGCAGC	CTCAGGGTAAC	AATTCACCCCTCCACTTTGGGAATGGG CCAGGTCAA	V11.1	D1	J1.6
10	ALC-T	TGTGCCAGTAGC	AAAGGG	AATTCACCCCTCCACTTTGGGAATGGGA CCAGGCTCAA	V19.1	Dn	J1.6
11	ALC-T	TGTGCCAGCAGCTTA	AACAGGGGC	AATTCACCCCTCCACTTTGGGAATGGG CCAGGCTCA	V7.2	D1	J1.6
12	ALC-T	TGTGCCAGCAG	TTTGGGGGGGCGA	ATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGCACAC GCTCA	V27.1	D1	J2.1
13	ALC-T	TGTGCCAGTAG	GACACCCTCTGAGGG GGGCGCGG	GCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGATG GACTCGACTCTA	V19.1	D1	J1.5

14	ALC-T	TGTGCCAGTAG	TGAGGGACGGATGGT TGCTGG	CTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGAC AGGTTAAA	V30.1	D1	J1.2
15	ALC-T	TGCGCCAGCAGC	GCCCCTCGGGGCGC TGG	ATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCA	V5.6	D2	J1.2
16	ALC-T	TGTG CCAGCACC	CCGGACAGACAT	TCCTACGAGCAGTACTTCGGCnCCGGC CCnGGCTCAGGATCC	V7.9	D1	J2.7
17	ALC-0	TGTGCCAGCAG	CCTTGGACAGG	CAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGCAC	V20.1	D1	J2.1
18	ALC-0	TGCAGTGCT	CCCACAGTAGG	TATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC GGTTA	V5.1	D1	J1.2
19	PTCL	TGTGCCAGTAGTATA	ATAGTGGGGGACAGT GGCG	CTGAAGCTTCTTTGGACAAGGCACCA ACCTCA	V19.1	D1	J1.1
20	PTCL	TGTGCCAGCAGTTTA T	CGTGGGGTAGCGGTG	GCACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAG CACCCGGCTGA	V28.1	D2	J2.3
21	PTCL	TCTGCAGCGTTGAAG A	CAGGGGTT	TCCTACAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAG	V29.1	D1	J2.1
22	PTCL	TGTGCCAGCAGCTTA G	TCGGGACAGGAG	CCTACAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAG CACACG	V7.2	D1	J2.1
23	PTCL	TATGCCAGTAGTAT	TGTGAATTC	GAACACTGAAGCTTCTTTGGACAnGG ACCAGACTCA	V19.1	Dn	J1.1
24	PTCL	TGTGCCAGCAGCTT	CGGACAGGG	TGAAACACCATATATTTTGGAGAGGG AGTTGGCTC	V7.9	D1	J1.3
25	PTCL	TGTGCCAGTA	TGAATAGGACAGAG	AATCGAATCAGCCCCAGCATTTTGGTG TGGGACTCGACTCT	V29.1	D1	J1.5
26	ITCL	TGTGCCAGCAGTTAC	GGACAG	AATCACCCCTCCACTTTGGGAATGGG CCAGGCTCA	V6.3	Dn	J1.6
27	ITCL	TGTGCCAGCAGCTTG G	TTGACAGGGGGCAGC	ATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAG GTT	V6.5	D1	J1.2
28	ITCL	TGTGCCAGCAGTTAC T	GTGGGCCGACG	GAGACCCAGTACTTCGGGCCAGGCACAG	V9	D1	J2.5
29	AILD	TGTGCCTGGA	AGA	GAACCGGGACAGAACACTGAAGCTTTC TTGGACAAGG	V20.1	Dn	J1.1
30	AILD	TGTGCCAGCAGTTT	CAGTAGGGGA	AATGAAAACTGTTTTTGGCAGTGGAA CCCAGCTCTA	V19	Dn	J1.4
31	T-LBL	TGTACTTCTGTGCCA GC	TCCACGTGGGGG	CAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACT GACTCTA	V27.1	D1	J1.5
33	T-LBL	TCTGCAGTGCTA	TCTGGGCCGG	CTATAATTCACCCCTCCACTTTGGGAA GGGACCAGGCTCA	V20.1	Dn	J1.6
34	T-LBL	TCTGCAGCGTT	CCGGGACAGGGTGCA CCTACGAG	CAGTACTTCGGGCCAGGCACACGGTCA	V29.1	D1	J2.5
35	T-LBL	TGTGCCAGT	TCCGnCCnCAnAnn C	GCAGTAnTnGGCCCAGGCACCCGGCT	V19	D	J2.3
36	T-LBL	TGCAGTGCT	CAGCCTTCGAG	GGTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGG	V19.1	D2	J1.2
37	MOLT 4	TCTGCAGTGCTAG	AGAGTCGACTAGCGA TCCAAAA	AATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGCACA GGCTCAA	V20.1	D2	J2.1
38	Hut 102	TCTGCAGCGT	AGGCAGGAGCGGTT GGC	GGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGTT	V30	D2	J1.2
39	DHL-1	TGTGCCAGTAGTA	CAGTAGGGGA	ACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGC CCC GGCTG	V27	D1	J2.3

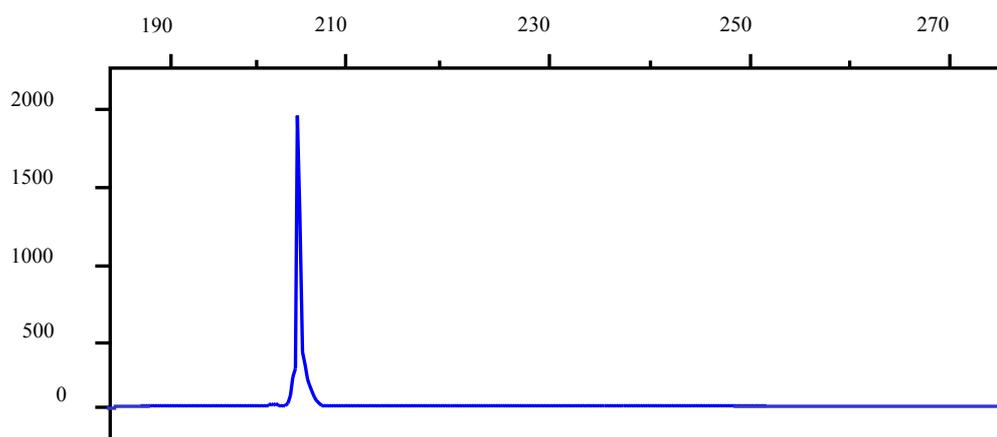
Sequenzdarstellung der TCR- $\beta$  Umlagerungen von T-NHL und T-Zell-Linien. Die Zuordnung der Keimbahnelemente V $\beta$  erfolgte nach der Klassifizierung von Rowen et al.<sup>15</sup> sowie D $\beta$  und J $\beta$  nach Toyonaga et al.<sup>16</sup> und Tunnacliffe et al.<sup>17</sup> Nicht eindeutig zuzuordnende Nukleotide sind als "n" gekennzeichnet. Sequenzen 1 und 2 sind von Hautproben eines Patienten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden sind. Sequenzen 4 und 5 sind von unterschiedlichen Gewebeproben (4=Haut und 5=Lymphknoten) eines Patienten.

#### 4.1.10 Optimierung einer TCR- $\gamma$ PCR

Zum Vergleich mit der TCR- $\beta$  PCR optimierten wir eine im Institut für Pathologie bereits etablierte TCR- $\gamma$  PCR, mit der wir sowohl Gefriermaterial als auch Formalin-fixierte Proben analysierten<sup>46</sup>. Diese PCR ist ebenfalls ein geschichtetes PCR-System (semi-nested PCR) mit zwei getrennten PCR-Ansätzen. Ansatz 1: V $\gamma$ con (V $\gamma$  I-Familie = V $\gamma$  1-8) in Kombination mit JGT1.2 (J $\gamma$ 1,2) und Ansatz 2: V $\gamma$ con in Kombination mit JGT3<sup>38</sup> (J $\gamma$ P1,P2). Durch Hinzufügen von Primersets für die V $\gamma$  II-Familie (V $\gamma$ 9)<sup>38</sup> und V $\gamma$  III-Familie (V $\gamma$ 10 + V $\gamma$ 11)<sup>38</sup> jeweils in Kombination mit JGT1.2 bzw. JGT3, stand ein Primersystem zur Verfügung, welches nun in der Lage ist nahezu alle möglichen TCR- $\gamma$  Umlagerungen zu erkennen<sup>70</sup>.

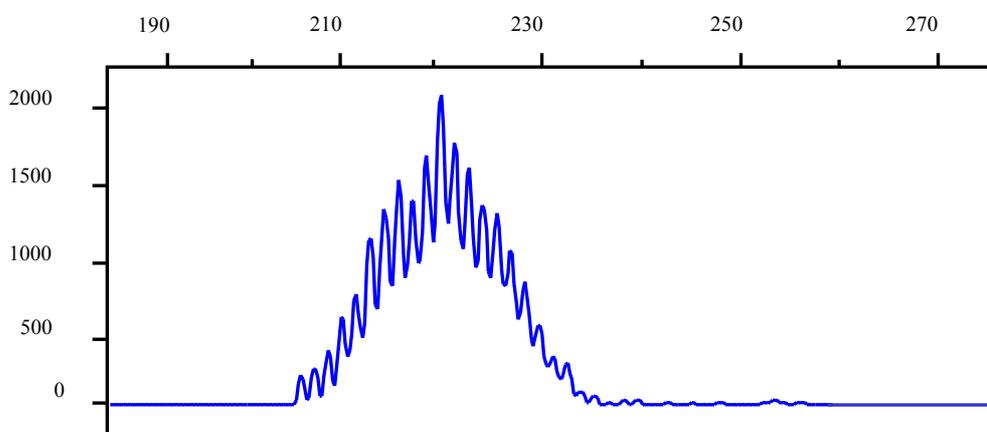
#### 4.1.11 Spezifität der TCR- $\gamma$ PCR

Zur Überprüfung der Spezifität der optimierten TCR- $\gamma$  PCR untersuchten wir analog zur Vorgehensweise der TCR- $\beta$  PCR zunächst die gleichen T-Zell-Linien. Alle untersuchten T-Zell-Linien zeigten im Polyacrylamidgel bild eine monoklonale, scharf begrenzte Bande ohne Hintergrund und einen einzelnen Peak in der GENESCAN-Analyse (Abb. 8).



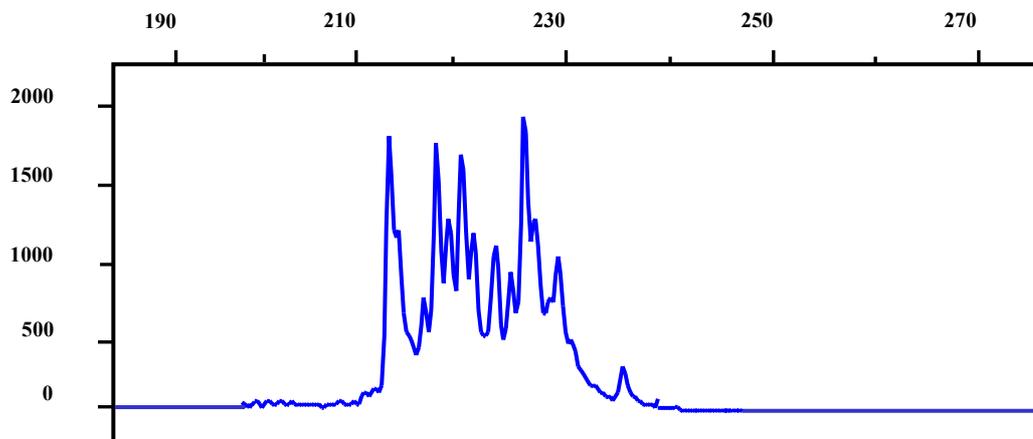
**Abb. 8:** GENESCAN-Analyse einer monoklonalen TCR- $\gamma$  Umlagerung, exemplarisch dargestellt an der T-Zell-Linie Hut 102 (205 bp).

Die Analyse der reaktiven Lymphadenopathien, B-Non-Hodgkin-Lymphome sowie normaler Blutproben ergaben im Polyacrylamidgelbild ein Bandenschmier, welcher sich in der GENESCAN-Analyse durch ein Bandenspektrum mit einem der Gaußschen Verteilungskurve ähnlichem Verteilungsmuster darstellt. Die Verteilung der Peaks variiert zwischen 192 und 220 (JGT1.2) und 210 und 238 (JGT3) Basenpaare. Im Gegensatz zur TCR- $\beta$  PCR sind hier die einzelnen Fragmentgruppen in einem 1bp-Abstand verteilt (Abb. 9). Dies deutet auf eine Vielzahl von TCR- $\gamma$  Umlagerungen hin, die einen nicht-kodierenden Leserahmen haben.



**Abb. 9:** GENESCAN-Bild einer polyklonalen TCR- $\gamma$  Umlagerung am Beispiel der Analyse von normalem Tonsillengewebe. Beachte: Im Vergleich zur TCR- $\beta$  PCR haben die PCR-Produkte nur einen 1 bp - Abstand.

Die Untersuchungen von reaktiven extranodalen Läsionen wie z.B. entzündlichen Hautläsionen (12 Fälle mit Psoriasis vulgaris, 4 Fälle mit chronischer Dermatitis) ergaben meist ein *oligoklonales* Bild, bestehend aus 3-5 PCR-Produkten (Abb. 10). Diese PCR-Produkte stellten sich im Polyacrylamidgelbild als einige wenige Banden dar, die sich erst in der wesentlich höheren Auflösung der GENESCAN-Technik als mehrere Amplifikatgrößen darstellen.



**Abb. 10:** GENESCAN-Analyse der TCR- $\gamma$  Umlagerungen einer reaktiven extranodalen Veränderung (Psoriasis). Wenige Peaks als Beispiel einer oligoklonalen TCR- $\gamma$  Umlagerung.

#### 4.1.12 Sensitivität der TCR- $\gamma$ PCR

Die Sensitivität der beiden TCR- $\gamma$  PCRs wurde mit Verdünnungsreihen der T-Zell-Linien Hut 102 (Primerkombination: JGT1.2) und PEER (Primerkombination: JGT3) in einer normalen menschlichen Tonsille ermittelt. Analog zur TCR- $\beta$  PCR waren alle PCR-Nachweise in der Lage etwa 1 % klonal umgelagerter T-Zellen in einem polyklonalen Hintergrund (ca. 1 ng T-Zell Linien-DNA in 100 ng Tonsillen DNA) zu detektieren.

## **4.2 Untersuchung von Patientenmaterial**

Basierend auf der neu entwickelten und optimierten familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR in Kombination mit der GENESCAN-Analyse wurden Blut- und Gewebeproben von insgesamt 114 Patienten untersucht. Darunter wurden 132 Gewebe- und Blutproben von 62 Patienten mit der TCR- $\beta$  PCR analysiert sowie mit einer optimierten TCR- $\gamma$  PCR verglichen. Dabei stammt das Untersuchungsmaterial zum einen Teil von einem klinisch und histologisch gut charakterisierten Kollektiv von Patienten mit CTCL (23) fortgeschrittener Stadien und zum anderen Teil von nicht-kutanen T-NHL-Patienten (39) verschiedener Entitäten (12 ALCL-T, 11 PTCL, 9 ALL, 4 ITCL, 3 AILD).

Ferner wurden ausschließlich mit der TCR- $\beta$  PCR (ohne Vergleich mit der TCR- $\gamma$  PCR) weitere 52 Proben aus Routineeingängen des Instituts für Pathologie untersucht. Dabei konnte eine monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung in 2/11 HD-T, 3/9 NK/T-NHL, 19/21 ALCL-T/0, 5/5 PTCL und 6/6 AILD nachgewiesen werden.

### **4.2.1 Molekularbiologische Verlaufsuntersuchungen von CTCL-Patienten mittels TCR- $\beta$ PCR im Vergleich zur TCR- $\gamma$ PCR**

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Dermatologie des UKBF haben wir 96 Proben (Haut, Blut, Lymphknoten) von 23 Patienten eines klinisch standardisierten Patientenkollektivs mit histologisch/immunhistologisch gesichertem kutanen T-Zell-Lymphom (19 Mycosis fungoides, 4 Sézary Syndrom) mittels familienspezifischer TCR- $\beta$  PCR untersucht. Zum Vergleich der TCR- $\beta$  PCR-Ergebnisse analysierten wir alle Proben parallel mit der TCR- $\gamma$  Methode (Tab. 8).

**Tab. 8: Klinische Daten sowie TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$  PCR-Ergebnisse von 23 Patienten mit fortgeschrittenem kutanem T-Zell-Lymphom**

Patient	Entität	Alter	Geschlecht	Klin.Stad.	TNM-Stad.	CTCL-SI	TCR- $\beta$ -R	TCR- $\gamma$ -R
1	MF	71	M	II b	T3N3M0	17	m	m
2	MF	66	F	II b	T3N0M0	18	m	m
3	MF	60	M	II b	T3N0M0	18	m	p
4	MF	60	F	II b	T3N0M0	14	m	m
5	MF	41	M	III	T4N0M0	15	m	p
6	MF	72	F	III	T4N0M0	15	m	m
7	MF	47	F	IV a	T3N3M0	33	m	m
8	MF	41	M	IV a	T3N3M0	27	m	p
9	MF	70	M	IV a	T3N3M0	37	m	p
10	MF	45	F	IV a	T4N3M0	30	m	m
11	MF	76	M	IV a	T4N3M0	30	m	m
12	MF	64	M	IV a	T4N3M0	30	m	m
13	MF	34	M	IV a	T4N3M0	30	m	m
14	MF	77	F	IV a	T3N3M0	30	m	m
15	MF	63	M	IV a	T4N3M0	30	m	m
16	MF	60	F	IV a	T2N3M0	27	m	m
17	MF	64	M	IV a	T3N3M0	30	m	p
18	MF	80	M	IV a	T2N3M0	27	m	m
19	MF	78	F	IV b	T2N3B1M0	30	m	p
20	SS	62	F	IV a	T4N3B1M0	45	m	m
21	SS	79	M	IV a	T4N3B1M0	45	m	m
22	SS	78	M	IV b	T4N3B1M1	60	m	m
23	SS	61	M	IV b	T4N3B1M1	60	m	m
<b>Total</b>							<b>23/23</b>	<b>17/23</b>
							<b>100%</b>	<b>74%</b>

MF: Mycosis fungoides, SS: Sézary Syndrom, CTCL-SI: Cutaneous T-Cell Lymphoma Severity Index<sup>56</sup>, m= monoklonal, p= polyklonal

Das Probenmaterial bestand aus Haut- und Lymphknotenbiopsien (überwiegend Formalinfixiert) sowie Blutproben von CTCL-Patienten fortgeschrittener Stadien, die im Rahmen von Staginguntersuchungen über einen Zeitraum von 4 Jahren entnommen wurden.

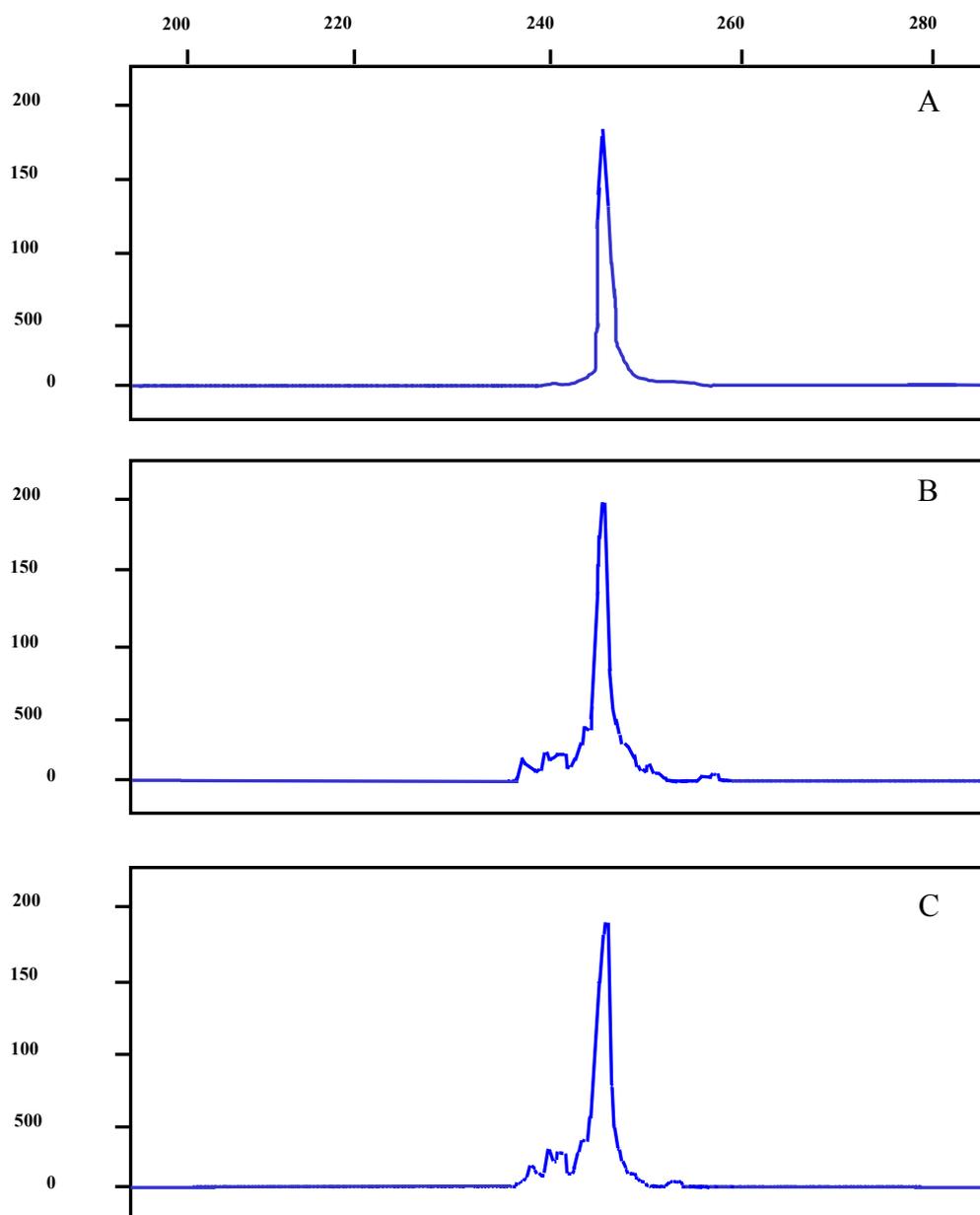
Die Untersuchung der primären Hautläsionen mittels familienspezifischer TCR- $\beta$  PCR ergab in allen 23/23 (100 %) Proben eine eindeutige Monoklonalität. Ferner fand sich in 83 % der untersuchten regionalen Lymphknoten und in 64 % der untersuchten Blutproben der identische Klon wie in der kutanen Primärläsion. Im Vergleich dazu konnte mittels TCR- $\gamma$  PCR in 17/23 primären Hautläsionen eine klonale T-Zellpopulation nachgewiesen werden (74 %). Die Analyse der korrespondierenden Lymphknoten und Blutproben zeigte eine Monoklonalität in 63 % bzw. 44 % der untersuchten Proben (Tab. 9).

**Tab. 9: TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$  PCR-Analyse von Haut-, Lymphknoten- und Blutproben von 23 Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom**

Patient	TCR- $\beta$ -R			TCR- $\gamma$ -R		
	Haut	LK	Blut	Haut	LK	Blut
1	+	na	na	+	na	na
2	+	+	na	+	+	na
3	+	na	na	-	na	na
4	+	na	na	+	na	na
5	+	-	-	-	-	-
6	+	+	na	+	+	na
7	+	+	na	+	+	na
8	+	+	-	-	na	na
9	+	+	-	-	-	-
10	+	+	na	+	+	na
11	+	+	na	+	+	na
12	+	+	-	+	+	-
13	+	+	+	+	na	na
14	+	+	+	+	+	-
15	+	na	na	+	na	na
16	+	na	na	+	na	na
17	+	+	+	-	-	-
18	+	+	na	+	+	na
19	+	+	na	-	-	na
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+

TCR- $\beta$ -R: TCR- $\beta$  Umlagerung, TCR- $\gamma$ -R: TCR- $\gamma$  Umlagerung, LK: Lymphknoten, na: nicht analysiert, +: monoklonal, -: polyklonal

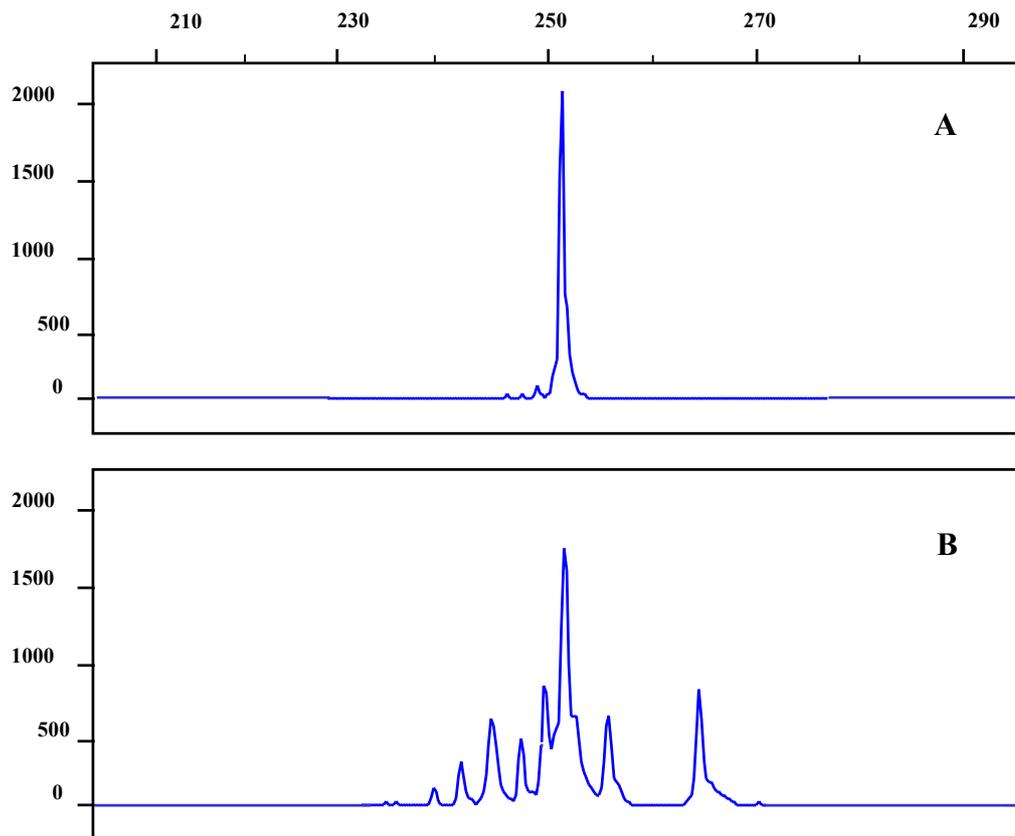
Die Untersuchung verschiedener Hautproben des gleichen Patienten, die sowohl von unterschiedlichen Lokalisationen als auch zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, spiegelten jeweils den gleichen Tumorklon wieder. Abhängig vom Stadium sowie der Progression der Erkrankung konnte der maligne T-Zellklon auch in den hautnahen Lymphknoten sowie im peripheren Blut detektiert werden (Abb. 11).



**Abb. 12:** TCR- $\beta$  PCR und GENESCAN-Analyse eines Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom. A: Hautbefall, B: Lymphknotenbefall und C: Infiltration des peripheren Blutes (Pat. 10). In allen drei Proben zeigte sich der identische T-Zellklon mit einer Basengröße von 243 bp.

Interessanterweise konnten wir in jeweils 2 Lymphknotenbiopsien (Tab. 9. Pat. 2 und 6) und in 3 Blutproben (Pat. 13, 14 und 17) den gleichen Klon wie in der Primärläsion mittels TCR- $\beta$  PCR detektieren, wobei es sich im Falle der Lymphknoten histologisch und immunhistologisch bzw. im Falle der Blutproben zytologisch keinen Anhalt für eine

Infiltration durch das bekannte T-Zell-Lymphom ergab. Dies deutet auf die höhere Sensitivität der TCR- $\beta$  PCR im Vergleich zu konventionellen Untersuchungen bei minimalen Tumordinfiltraten hin (Abb. 13).



**Abb. 13:** TCR- $\beta$  GENESCAN-Analyse. A. Primärtumor (Haut); B. Regionaler Lymphknoten um Zeitpunkt der Erstdiagnose (Histologie: unspezifische Lymphadenopathie). Beachte: Die gleiche klonale Umlagerung von 252 bp im Primärtumor läßt sich auch als dominanter Klon im Lymphknoten nachweisen als Hinweis einer minimalen Lymphominfiltration.

#### 4.2.2 TCR- $\beta$ Analyse transformierter kutaner T-Zell-Lymphome

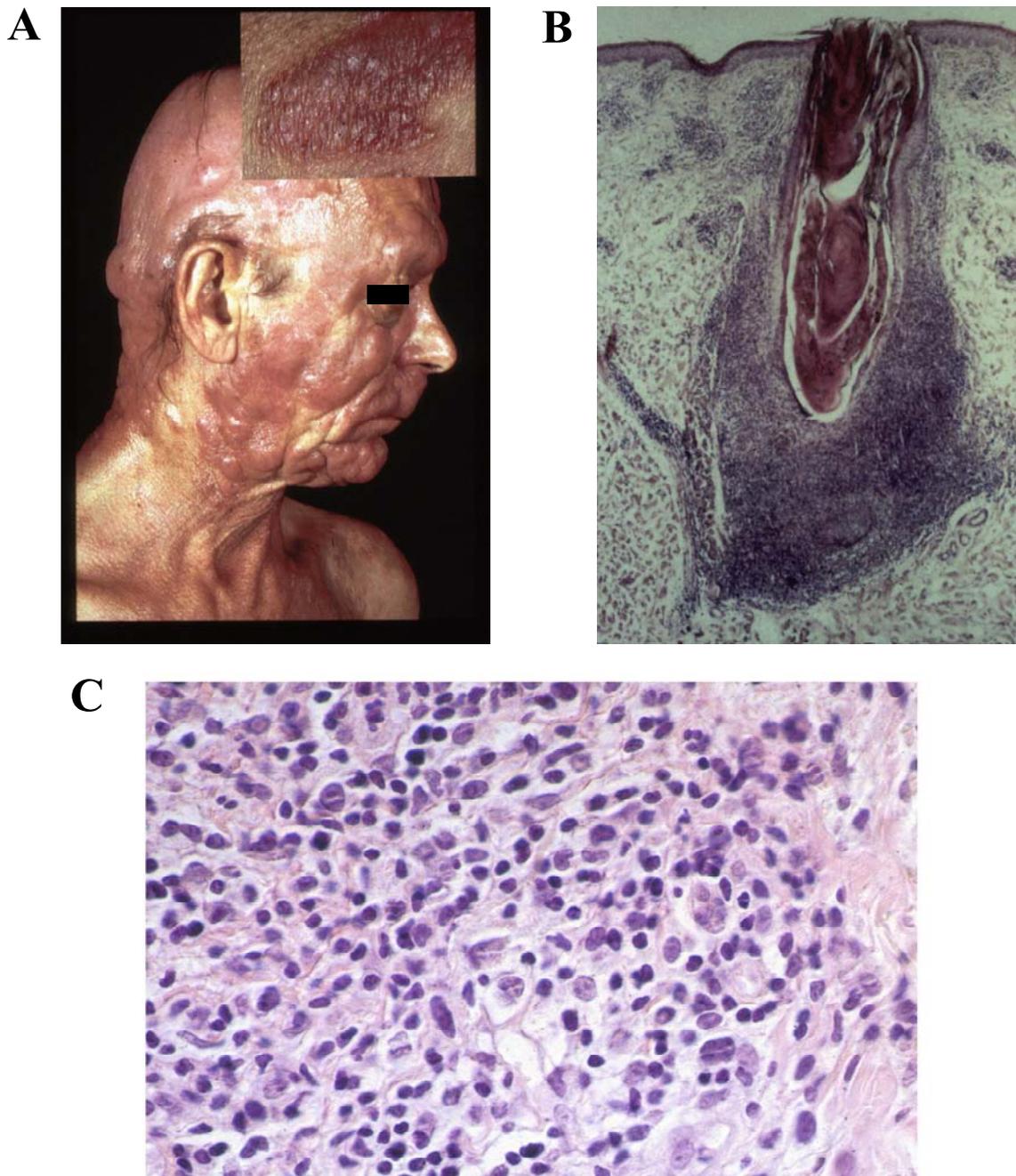
Einige der von uns untersuchten Patienten mit einem CTCL entwickelten im Verlauf ihrer Erkrankung eine sog. "Transformation" im Sinne eines Übergangs des bereits bestehenden Lymphoms in ein höher malignes T-Zell-Lymphom (Pat. 12, 13). Dieses ist nach histopathologischen Kriterien definiert und beinhaltet einen Anteil großer blastärer Zellen von mindestens 25 % des Gesamtinfiltrats und ist häufig mit einer phänotypischen Umwandlung assoziiert<sup>57,58,59</sup>.

Beim ersten Patienten (Pat. 12, Abb. 13A,B) transformierte das kleinzellige sog. "follikulotrope" CTCL in ein pleomorphes CTCL mit einer Neuexpression des CD25-Antigens. Beim zweiten Patienten, ebenfalls ein initial kleinzelliges CTCL, transformierten die Tumorzellen in z.T. große anaplastisch anmutende, z.T. Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-artige Zellen mit einer zusätzlichen Neuexpression des CD30-Antigens (Pat.13). Diese starken Unterschiede sowohl in der Zellmorphologie als auch später im klinischen Verlauf ließen die Frage aufkommen, ob es sich um eine sekundäre Veränderung des gleichen Tumors oder um ein Neuauftreten einer zweiten zusätzlichen Neoplasie handelt? Um diese Frage zu beantworten, wurden sowohl die Primärläsionen als auch die Folgeläsionen mittels der familienspezifischen TCR- $\beta$  PCR analysiert und die dominanten Amplifikationsprodukte sequenziert und miteinander verglichen.

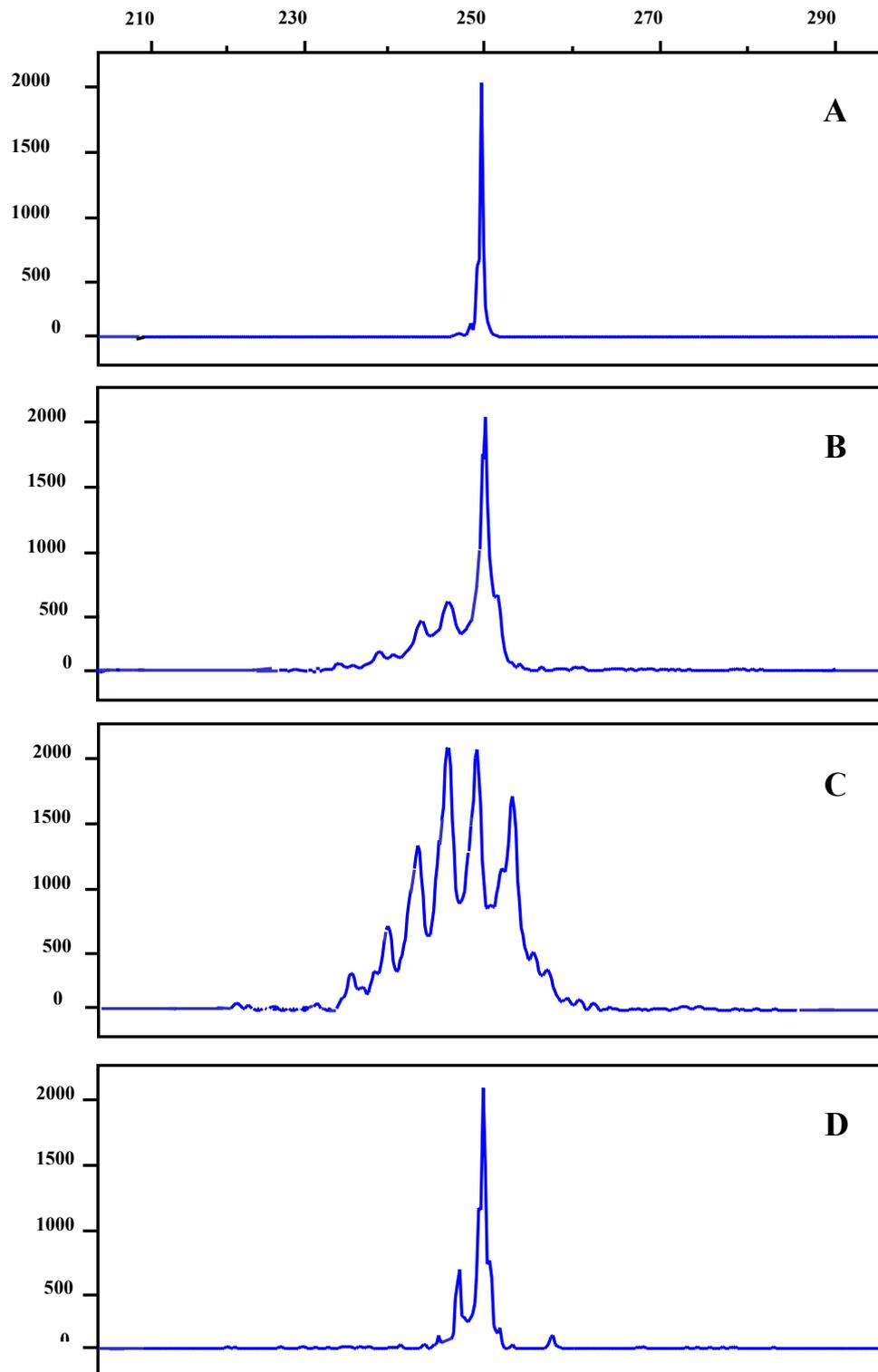
Die TCR- $\beta$  PCR mit nachfolgender GENESCAN-Analyse (Abb.14) aus einer initialen Hautläsion zeigt ein monoklonales Amplifikationsprodukt von 250 bp (Pat. 12). Die Analyse des sechs Monate später extirpierten Lymphknotens zeigt molekularbiologisch eine Lymphommanifestation durch den gleichen malignen T-Zellklon. Zwei Jahre später kam es jedoch zu einem Progress der Erkrankung mit einer Transformation des CTCL in ein pleomorphes T-Zell-Lymphom mit Größenzunahme der Tumorzellen, einer hochgradigen Proliferationsrate von ca. 80 % und einer diffusen Infiltration der Haut ohne Follikelbindung (Abb. 13C). Molekularbiologisch konnte aus einem solchen Tumorknoten der gleiche T-Zellklon mittels TCR- $\beta$  PCR identifiziert werden (Abb. 14). Die Sequenzierung der TCR- $\beta$  PCR-Produkte sowohl der Primärläsion als auch der zwei Jahre später entstandenen Tumoren zeigte die identische klonspezifische Sequenz (identische N-D-N-Region, s.Tab. 7).<sup>60</sup> Analog

zu diesen Befunden konnte auch bei Patient 13 der identische T-Zellklon sowohl im kleinzelligen CTCL als auch im daraus hervorgegangenem anaplastisch großzelligem T-Zell-Lymphom nachgewiesen werden.

Die Klonalitätsanalyse mittels familienspezifischer TCR- $\beta$  PCR bestätigt anhand der dargestellten Beispiele, daß eine Transformation eines T-Zell-Lymphoms eine phänotypische Umwandlung der bereits entarteten klonalen T-Zelle in ein noch maligneres T-Zell-Lymphom ist.



**Abb. 14:** **Klinisches und histologisches Erscheinungsbild eines Patienten mit einem transformierten kutanen T-Zell-Lymphom.** A) Follikuläre Mycosis fungoides mit knotigen Tumoren im Gesicht und am Schädel nach Transformation. Im Insert erkennt man die um die Haarfollikel lokalisierten erythematösen Plaques (vor Transformation). B) Perifollikuläre und folliculäre Infiltration kleiner Lymphozyten mit Aussparung der interfollikulären Epidermis (H&E x40). C) Z.n. Transformation in ein mittelgroß-großzelliges pleomorphes T-Zell-Lymphom mit großen, z.T. blastär anmutenden Lymphozyten (H&E x200).



**Abb. 15:** Follow-up mittels TCR- $\beta$  PCR und GENESCAN-Analyse eines Patienten (Pat.12) mit CTCL. A: Plaque-Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, B: Lymphknotenbefall 6 Monate später, C: peripheres Blut zum Zeitpunkt des Lymphknotenbefalls, D: Hautrezidiv 2 Jahre später nach Chemotherapie. Zur Darstellung kommt die gleiche TCR- $\beta$  Umlagerung (250 bp) in allen Gewebeproben. Das periphere Blut ist nicht erkennbar befallen.

### **4.2.3 Klonalitätsanalysen von nicht-kutanen T-NHL mittels TCR- $\beta$ PCR im Vergleich zur TCR- $\gamma$ PCR**

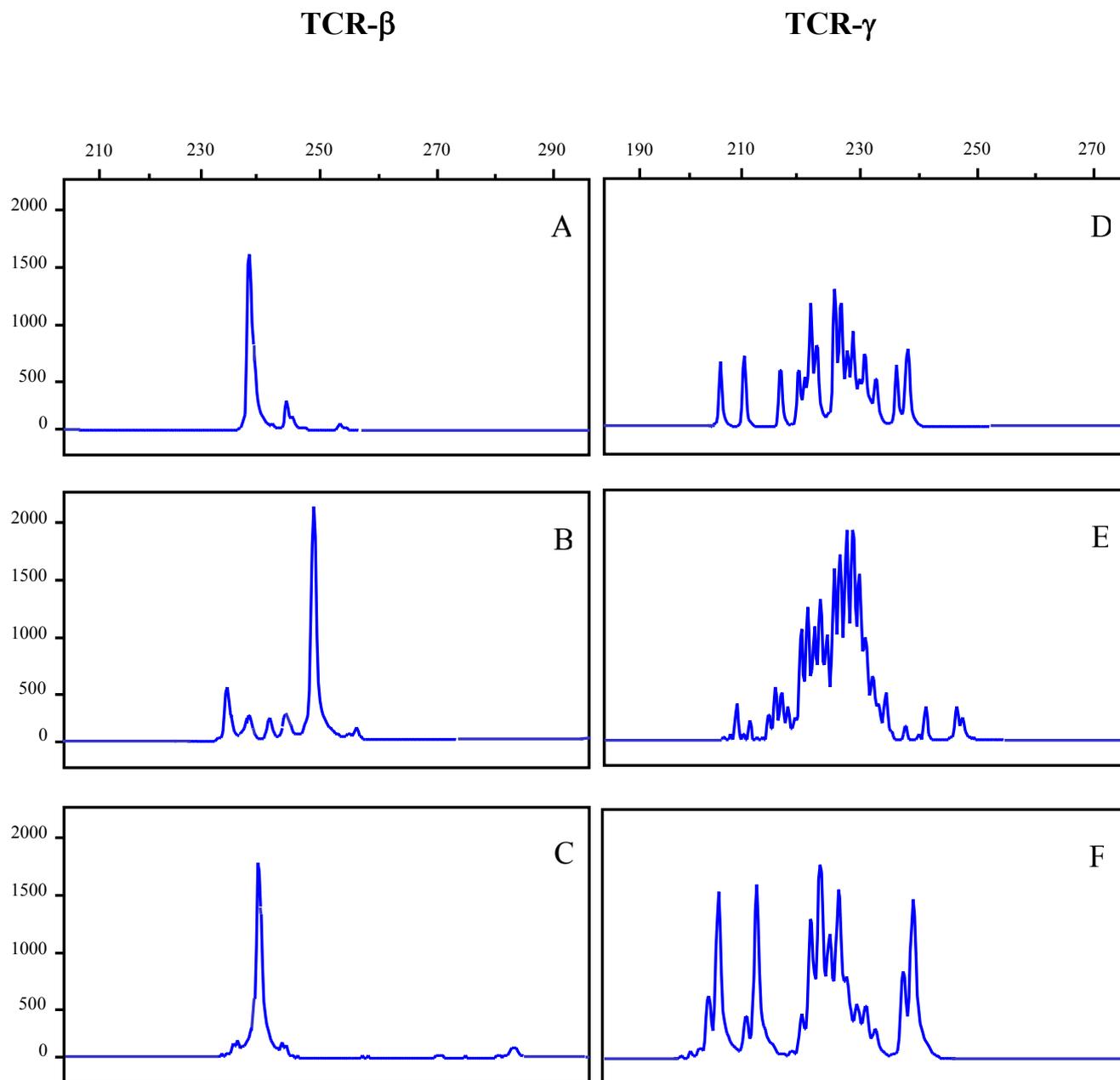
Um die Zuverlässigkeit der neuentwickelte TCR- $\beta$  PCR auch an verschiedenen T-Zell-Lymphom Entitäten diverser Lokalisationen zu überprüfen, untersuchten wir zusätzlich zu den bereits beschriebenen CTCL's 39 nicht-kutane T-Zell-Lymphome. Dabei beinhaltete dieses Kollektiv 11 periphere unspezifizierte T-Zell-Lymphome, 3 angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome, 9 akute T-Zell-Leukämien, 12 anaplastisch großzellige T-Zell-Lymphome vom T-Zell Typ sowie 4 intestinale T-Zell-Lymphome (s. Tab 10). Zum Vergleich wurden alle Proben mit der TCR- $\gamma$  PCR analysiert.

Mittels TCR- $\beta$  PCR konnte in allen bis auf einen Fall (38/39, 97 %) eine klonale TCR- $\beta$  Umlagerung nachgewiesen werden, während die TCR- $\gamma$  PCR eine Monoklonalität in 33/39 (85 %) Fällen darstellen konnte<sup>70</sup>. Der fehlende Nachweis einer klonalen T-Zell Proliferation mittels TCR- $\gamma$  PCR zeigte, mit Ausnahme der T-ALL, keinen Zusammenhang mit der Entität oder Lokalisation des Lymphoms.

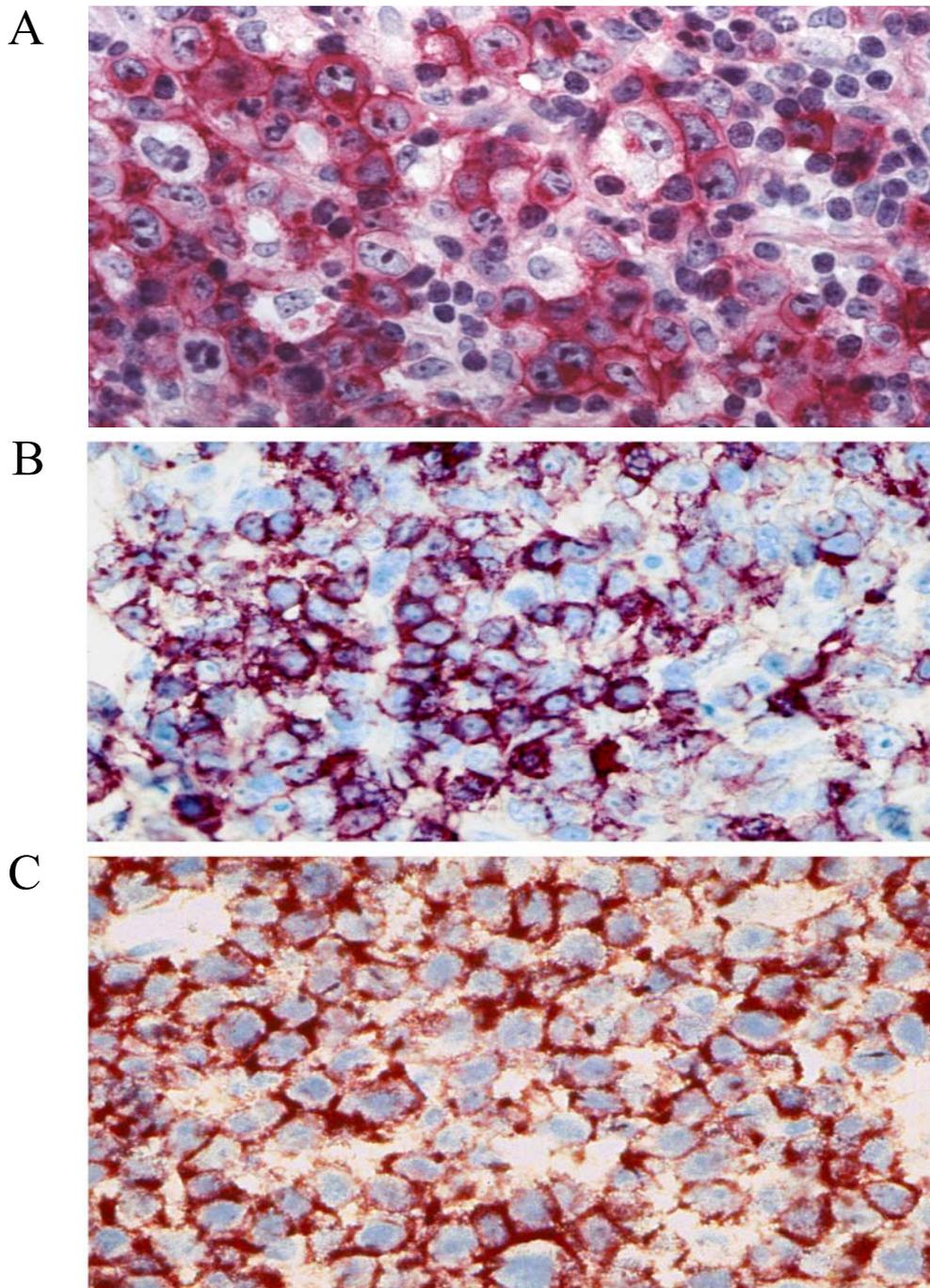
Desweiteren konnten wir mittels TCR- $\beta$  PCR in mehreren Biopsien des gleichen Patienten sowohl in unterschiedlichen Lokalisationen als auch im zeitlichen Verlauf (Beobachtungszeitraum bis zu drei Jahren) den identischen malignen T-Zellklon nachweisen (z.B. multiple Duodenal -bzw. Magenbiopsien von Pat. 59 und 62)<sup>118,119</sup>.

**Tab. 10: Klinische Daten sowie TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$  PCR-Ergebnisse von 39 Patienten mit nicht-kutanen T-Zell-Lymphomen**

Patient	Entität	Alter	Lokalisation	TCR- $\beta$ -R	TCR - $\gamma$ -R
24	PTCL		Lymphknoten	m	m
25	PTCL		Lymphknoten	m	m
26	PTCL		Knochenmark	m	m
27	PTCL		Lymphknoten	m	m
28	PTCL		Lymphknoten	m	m
29	PTCL		Zunge	m	m
30	PTCL		Lymphknoten	<b>p</b>	m
31	PTCL		Lymphknoten	m	<b>p</b>
32	PTCL		Lymphknoten	m	m
33	PTCL		Zunge	m	<b>p</b>
34	PTCL		Haut	m	<b>p</b>
35	AILD		Tonsille	m	m
36	AILD		Lymphknoten	m	m
37	AILD		Lymphknoten	m	m
38	T-ALL		Lymphknoten	m	m
39	T-ALL		Pleura	m	m
40	T-ALL		Brust	m	m
41	T-ALL		Pleura	m	m
42	T-ALL		Mediastinaltumor	m	m
43	T-ALL		Mediastinaltumor	m	m
44	T-ALL		Lymphknoten	m	m
45	T-ALL		Lymphknoten	m	m
46	T-ALL		Mediastinaltumor	m	m
47	ALCL		Weichgewebe	m	m
48	ALCL		Weichgewebe	m	m
49	ALCL		Lymphknoten	m	m
50	ALCL		Lymphknoten	m	m
51	ALCL		Lymphknoten	m	m
52	ALCL		Lymphknoten	m	m
53	ALCL		Lymphknoten	m	<b>p</b>
54	ALCL		Lymphknoten	m	<b>p</b>
55	ALCL		Haut	m	m
56	ALCL		Lymphknoten	m	m
57	ALCL		Weichgewebe	m	m
58	ALCL		Weichgewebe	m	m
59	ITCL		Magen	m	m
60	ITCL		Dünndarm	m	<b>p</b>
61	ITCL		Dünndarm	m	m
62	ITCL		Dünndarm	m	m



**Abb. 16:** Dargestellt ist der direkte Vergleich von 3 T-Zell-Lymphomen mit monoklonaler TCR- $\beta$  Umlagerung (A-C) und poly/oligoklonaler TCR- $\gamma$  Umlagerung mittels GENESCAN-Analyse. (A,D) Anaplastisch großzelliges Lymphom. (B,E) Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert. (C,F) Intestinales T-Zell-Lymphom.



**Abb. 17:** Immunhistologische Darstellung von 3 T-Zell-Lymphomen mit monoklonaler TCR- $\beta$  Umlagerung und poly/oligoklonaler TCR- $\gamma$  Umlagerung (APAAP):  
 A: Anaplastisch großzelliges Lymphom. Die atypischen neoplastischen Zellen zeigen eine starke Expression des CD30 Antigens (x300).  
 B: Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert. Immunhistologische Darstellung der CD4 Expression (x400).  
 C: Intestinales T-Zell-Lymphom. Immunhistologische Darstellung der CD4 Expression (x400).

#### 4.2.4 Untersuchung von reaktiven Hautveränderungen mittels TCR- $\beta$ und TCR- $\gamma$ PCR

Die Unterscheidung entzündlicher von malignen T-Zellproliferationen ist im Vergleich zu lymphatischem Gewebe besonders in der Haut eine sehr schwierige differentialdiagnostische Entscheidung. Um den direkten Vergleich mit der Untersuchung kutaner T-Zell-Lymphome zu gewährleisten, wählten wir daher als "Negativkontrollen" Hautbiopsien von 16 Patienten mit klinisch und histologisch eindeutigen entzündlichen Dermatosen, die weder in der Vergangenheit noch während des Beobachtungszeitraums (4 Jahre) eine maligne Erkrankung entwickelten (Tab. 11, 12 Biopsien aus Läsionen von Psoriasis vulgaris und 4 unspezifische Dermatitis).

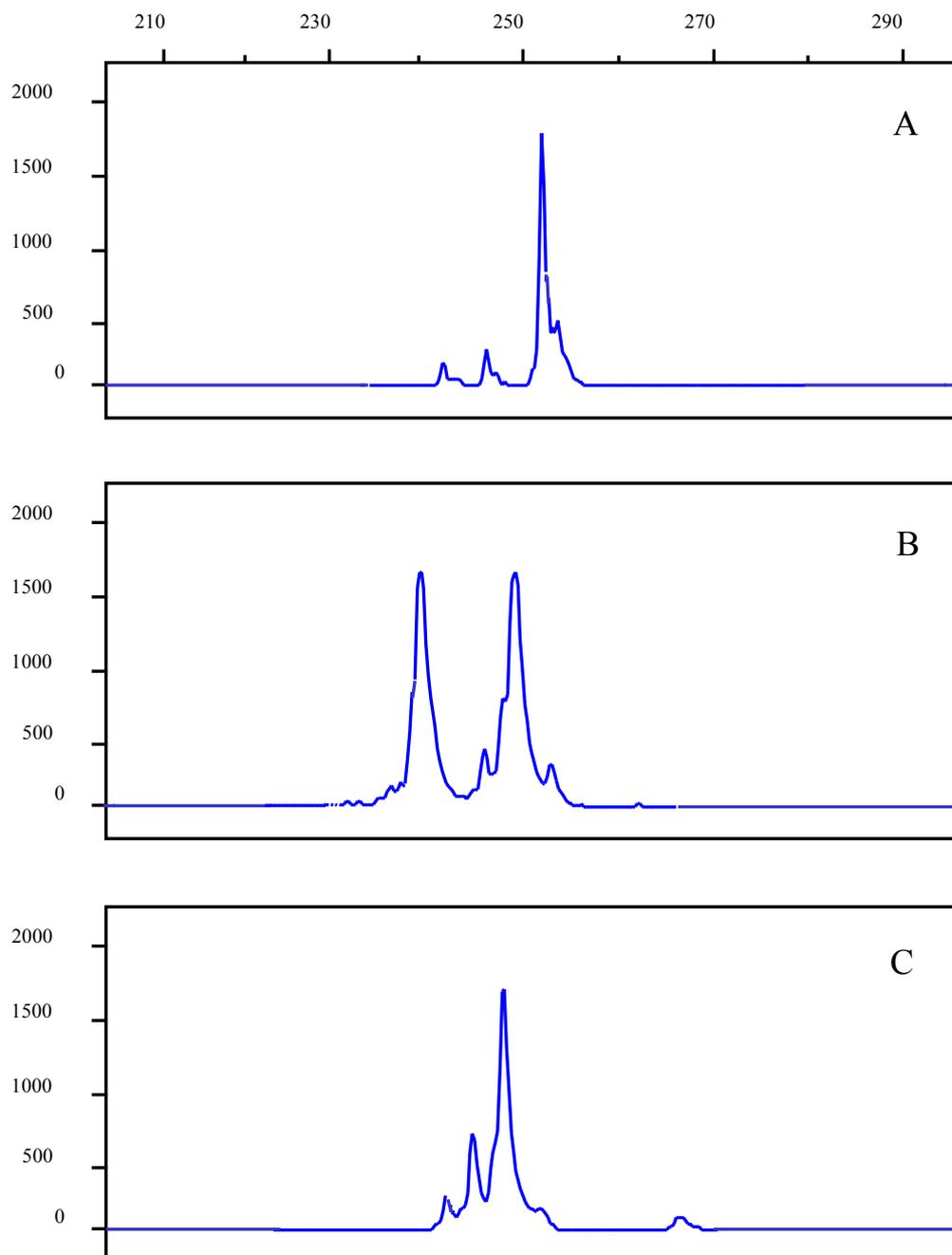
**Tab. 11: Klinische Daten sowie TCR- $\beta$  und TCR- $\gamma$  PCR Ergebnisse von 16 Patienten mit entzündlichen nicht-malignen Dermatosen**

Patient	Entität	Alter	Geschlecht	TCR $\beta$ -R	TCR $\gamma$ -R
1	Psoriasis	56	M	o/p	o/p
2	Ekzem	25	F	o/p	pm
3	Psoriasis	35	M	o/p	o/p
4	Ekzem	70	M	o/p	o/p
5	Ekzem	55	F	o/p	o/p
6	Ekzem	52	M	o/p	o/p
7	Psoriasis	38	F	o/p	o/p
8	Psoriasis	60	F	o/p	o/p
9	Psoriasis	33	M	o/p	o/p
10	Psoriasis	79	M	o/p	o/p
11	Psoriasis	74	M	o/p	o/p
12	Psoriasis	30	M	pm	pm
13	Psoriasis	75	F	o/p	pm
14	Psoriasis	45	M	o/p	o/p
15	Psoriasis	45	M	o/p	o/p
16	Psoriasis	48	M	pm	o/p

o/p= oligo-polyklonal, pm= pseudomonoklonal

Im Gegensatz zur Analyse normaler Blut- und Lymphknotenproben zeigten sowohl die TCR- $\beta$  als auch die TCR- $\gamma$  PCR mit nachfolgender GENESCAN-Auflösung in den meisten Proben ein betont oligoklonales Bild. In einigen Proben zeigte sich ein deutlich dominanter Peak bei nur geringem polyklonalen Hintergrund. Die wiederholte Analyse dieser Proben zeigte jedoch

im Gegensatz zu den T-NHL, daß die dominanten Peaks in verschiedenen PCRs unterschiedliche Größen haben (pseudomonoklonal) und sich nicht reproduzieren lassen (Abb. 18).



**Abb. 18:** Wiederholte TCR- $\beta$  PCR Analyse der gleichen entzündlichen Hautprobe in verschiedenen PCRs (Psoriasis). Beachte: Die dreimal unabhängig voneinander durchgeführte TCR- $\beta$  PCR ergibt jedesmal eine unterschiedliche Amplifikatgröße (A: 252 bp, B: 243 bp und 249 bp, C: 247 bp).

#### 4.2.5 Zusammenfassender Vergleich der familienspezifischen TCR- $\beta$ - mit TCR- $\gamma$ PCR

Die TCR- $\gamma$  PCR ist aufgrund der relativ einfachen Struktur des TCR- $\gamma$  Gens, trotz einer hohen "Falsch-negativ Rate", die zur Zeit am häufigsten verwendete Methode in der Diagnostik von T-Zell-Lymphomen/Leukämien. Wir untersuchten mittels familienspezifischer TCR- $\beta$  PCR und GENESCAN-Technik 132 DNA-Proben aus Lymphknoten- und Hautbiopsien sowie aus Blutproben von 62 Patienten mit klinisch verschiedenen und histologisch eindeutigen T-Zell-Lymphomen und Leukämien. Als Ergebnis konnte bei allen Patienten bis auf einen Fall eine monoklonale TCR- $\beta$  Umlagerung dargestellt werden (61/62, 98,4 %). Zum direkten Vergleich untersuchten wir die gleichen Proben mit einer optimierten, das komplette TCR- $\gamma$  Gen umfassende (V $\gamma$ I-III Familie), PCR mit nachfolgender GENESCAN-Technik<sup>46</sup>. Mit dieser Methode konnte eine Monoklonalität in 50/62 Patienten (80 %) dargestellt werden. Diese Detektionsrate steht in Einklang mit den bisher publizierten TCR- $\gamma$  Arbeiten<sup>39,40,41,42,43,45</sup>. In 12/62 Fällen (20 %) konnte im Gegensatz zur TCR- $\beta$  PCR mittels TCR- $\gamma$  PCR keine Monoklonalität dargestellt werden. Mit Ausnahme der T-Zell Leukämien, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Detektionsrate und Lymphomentität, deren Lokalisation oder deren Tumorzellanteil.

**Tab. 12: Zusammenfassung der TCR- $\beta$ - und TCR- $\gamma$  PCR-Ergebnisse:**

	<b>n</b>	<b>TCR-<math>\beta</math>-R</b>	<b>TCR-<math>\gamma</math>-R</b>
<b>T-Zell-Lymphome</b>	<b>62</b>	<b>61/62 (98%)</b>	<b>50/62 (80%)</b>
<b>Kontrollen</b>			
B-Zell-Lymphome	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)
Lymphadenopathien	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)
PBL	10	0/10 (0%)	0/10 (0%)
Entzündliche Dermatosen	16	0/16 (0%)	0/16 (0%)
T-Zell-Linien	8	8/8 (100%)	8/8 (100%)

PBL: Periphere Blutlymphozyten gesunder Spender.